

# **UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración



**UTILIZACION DE RESIDUOS INDUSTRIALES LIQUIDOS  
POR MICROORGANISMOS DE LA FAMILIA  
*THRAUSTOCHYTRIACEAE* PARA LA PRODUCCION DE  
ACIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA, C22:6 n-3)**

---

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

---

**BENITA QUILODRÁN TOLOZA**

**TEMUCO-CHILE  
2010**

UTILIZACION DE RESIDUOS INDUSTRIALES LIQUIDOS POR  
MICROORGANISMOS DE LA FAMILIA *THRAUSTOCHYTRIACEAE* PARA LA  
PRODUCCION DE ACIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA, C22:6n-3)

Esta tesis es presentada bajo la supervisión de la Directora de Tesis Dra. Carolina Shene De Vidts, del Departamento de Ingeniería Química para su aprobación por la comisión.

BENITA HORTENSIA QUILODRÁN TOLOZA

.....  
DIRECTOR PROGRAMA  
DE POSTGRADO EN CIENCIAS  
DE RECURSOS NATURALES

.....  
Dra. CAROLINA SHENE

.....  
Dr. ANDRES QUIROZ

.....  
Dr. HELLMUTH LEAL

.....  
DIRECCION DE POSTGRADO  
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

.....  
Dra. LILIAN MASSON

.....  
Dra. MARIA ELVIRA ZUÑIGA

## RESUMEN

Los traustoquitridos son un grupo de protistas marinos que han adquirido gran importancia en los últimos años por su capacidad de producir ácido grasos poli-insaturados de cadena larga como el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) y ácido eicosapentaenoico (EPA, 22:5 n-3). Cepas específicas de estos microorganismos oleaginosos son una alternativa viable en la producción industrial de DHA. Estudios muy preliminares los presentan como potenciales fuentes de pigmentos carotenoides como astaxantina (3,3 '-dihidroxi-β, β'-caroteno-4, 4'-diona, ASX) de gran importancia por su capacidad antioxidante (10 veces superior a otros pigmentos). Uno de los problemas que ha retrasado el desarrollo a nivel industrial de todos estos productos, es el costo de producción entre los cuales se encuentran aquellos asociados a los nutrientes utilizados para el crecimiento de los microorganismos.

Como los traustoquitridios producen enzimas extracelulares y son capaces de degradar una serie de compuestos orgánicos complejos, se ha planteado la posibilidad de utilizar fuentes nutricionales alternativas de bajo costo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial del subproducto de la fabricación de la cerveza (RC), rico en nutrientes (proteínas, carbohidratos solubles y minerales), y los residuos líquidos del procesamiento de las papas fritas (RP1 y RP2), que contienen almidón, para la producción de DHA por tres cepas nativas de traustoquitridios. Las cepas nativas *Thraustochytriidae* sp. M12-X1, *Thraustochytriidae* sp. C41 y *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 aisladas desde la zona costera en Chinquihue, Puerto Montt, Chile que presentan similitud a *Thraustochytrium kinnei* (99% identidad), *Schizochytrium minutum* (97% identidad), y 99%

de similitud a *Ulkenia sp*, respectivamente. Todas las cepas acumulan DHA, y además la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 acumula ASX. Fermentaciones en matraces usando RC, RP1 y RP2 como fuentes de C fueron realizadas para establecer el potencial de estas fuentes de nutrientes. La producción de DHA durante la fermentación de RC fue superior a las obtenidas en las fermentaciones de glucosa, maltosa y almidón para las cepas *Thraustochytriidae* sp. C41 y M12-X1. Para la cepa AS4-A1 la producción de DHA durante la fermentación de RC fue similar a la obtenida al usar almidón como fuente de C y superior a la obtenida en la fermentación de glucosa y maltosa. En las fermentaciones de RC suplementado con fuentes de nitrógeno, extracto de levadura (EL) y glutamato monosódico (GMS), todas las cepas produjeron la mayor concentración de biomasa (2,3 g/L, 5,9 g/L, por las cepas *Thraustochytriidae* sp. C41, M12-X1 y AS4-A1, respectivamente). Con respecto al contenido de DHA en los ácidos grasos producidos por las cepas de traustoquitridios nativos, éste fue dependiente de la fuente de C utilizada; los más altos porcentajes de DHA en los ácidos grasos totales para la cepas *Thraustochytriidae* sp. M12-X1, C41 y AS4-A1 fueron 57%, 27% y 23,4%, respectivamente. Aun cuando las cepas son capaces de producir DHA en la fermentación del RC como fuente de C y N, el uso de EL y GMS permitió incrementar la productividad en DHA. La mayor productividad de DHA se obtuvo con fermentaciones de RC-EL-GMS por las cepas *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 (55,1 mg/L/día) y AS4-A1 (88,0 mg/L/día) en relación al obtenido en la fermentación del mismo medio por la cepa *Thraustochytriidae* sp. C41 (11,4 mg/L/día). Para la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 al usar las fuentes de N y vitaminas (tiamina, biotina y cobalamina), se logró un aumento significativo de la productividad de DHA (540 mg/L/día), y la concentración de biomasa ( $14.9 \pm 0.4$  g/L) y DHA ( $2698 \pm 132$  mg/L). En todos los casos la producción de DHA tuvo lugar durante el periodo de crecimiento. La

ASX fue detectada en la biomasa en la fase de crecimiento tardía; la mayor productividad de ASX ( $63\pm3$  mg/L/día) se obtuvo en las fermentaciones de RC como única fuente de nutrientes.

## ABSTRACT

Thraustochytrids, marine protists, have been subjected of study in recent years because of their ability to produce long-chain polyunsaturated fatty acid, like docosahexaenoic (DHA, 22:6, n-3) and eicosapentaenoic (EPA 22:5, n-3) acids. These oleaginous microorganisms are a viable alternative for industrial production of DHA. Preliminary studies have also shown that these microorganisms are potential source of carotenoid pigments, such as astaxanthin (3,3 '-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta'$ -carotene-4, 4' -dione, ASX), which has a great importance because of its antioxidant capacity (10 times higher than of other pigments). A problem that has slowed the industrial-scale development of these products are the production costs among which are found those related to the price of nutrients needed for their cultivation.

Thraustochytrids produce extracellular enzymes. They are also capable of degrading a range of complex organic compounds. These features have led to consider alternative nutritional sources of low cost such as liquid residues from food industry.

Therefore the objective of this research was to evaluate the potential of the by-product from the beer production (RC) and liquid residues from potato chip processing (RP1 and RP2) for production of DHA by three native strains of thraustochytrids *Thraustochytriidae* sp. M12-X1, *Thraustochytriidae* sp. C41 and *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 isolated from the Chinquihue coastal zone in Puerto Montt, Chile similar to *Thraustochytrium kinnei* (99% identity), *Schizochytrium minutum* (97% identity), and 99% *Ulkenia* sp, respectively, were used. The strains are to be able to accumulate DHA; in addition *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 accumulates astaxanthin (ASX). Fermentations of RC, RP1 and RP2 as C sources were carried out to establish their potential. Production of

DHA during the fermentation of RB by *Thraustochytriidae* sp. C41 and *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 was superior to those obtained in the fermentations of glucose, maltose and starch. DHA production during RB fermentation by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 was similar to that obtained in starch fermentation and higher than the ones obtained in glucose and maltose fermentations.

In the fermentations of RC supplemented with nitrogen sources, yeast extract (YE) and monosodium glutamate (MSG), all the strains produced more biomass (2.3 g/L by *Thraustochytriidae* sp. C41 and *Thraustochytriidae* sp. M12-X1, and 5.9 g/L by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1). The DHA content in the fatty acids produced by the native thraustochytrid strains was dependent on the carbon source. The higher percentage of DHA in total fatty acids from strains *Thraustochytriidae* sp. M12-X1, C41 and AS4-A1 were 57%, 27% and 23.4%, respectively. Although the three strains were able to produce DHA in the RB fermentation as a source of carbon and nitrogen, addition of YE and MSG improve DHA productivity. The higher production of DHA was obtained in the fermentation of RB-YE-MSG by strains *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 [55.1 mg /L/day] and AS4-A1 [88.0 mg / L/day] in relation to the one obtained in the fermentation of the same medium by the *Thraustochytriidae* sp. C41 strain (11.4 mg/L/day). For strain *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1, a significant increase in DHA productivity (540 mg/L/day) was obtained when the nitrogen sources and vitamins (thiamine, biotin, and cobalamin) were added to the growth medium; this was due to the simultaneous increases in biomass ( $14.9 \pm 0.4$  g/L) and DHA ( $2698 \pm 132$  mg/L) concentrations. In all the cases the DHA production occurs in the growth period. The ASX was detected in the biomass at the end of growth rate phase; the greatest ASX productivity ( $63 \pm 3$  mg/L/day) was obtained in the fermentations of RC as the solely source of nutrients.

## INDICE

Resumen	ii
Abstract	iv
Indice de Tablas	ix
Indice de Figuras	xii

## CAPITULO I

<b>Lípidos en microorganismos marinos de la familia <i>Thraustochytriaceae</i></b>	1
1.1    Introducción	1
1.2    Microorganismo: traustoquitridios	4
1.3    Caracterización y reconocimiento	6
1.4    Habitat y ecología	8
1.5    Aislamiento y medio de cultivo	10
1.6    Biosíntesis de los ácidos grasos	14
1.6.1 Ácidos grasos saturados	14
1.6.2 Ácidos grasos insaturados	15
1.7    DHA y otros ácidos grasos en traustoquitridios	19
1.8    Otros lípidos producidos por traustoquitridios	27
1.8.1 Carotenoides	27
1.8.2 Escualeno	30
1.8.3 Esteroles	32
1.9    Conclusión	35
1.10    Investigación propuesta	38
1.11    Hipótesis	39
1.12    Objetivo General	39
1.13    Objetivos específicos	39

## CAPITULO II

<b>Potencial producción heterotrófica de ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA) por cepas nativas de traustoquitridios en diferentes medios de cultivos.</b>	41
---	----

2.1.	Resumen	41
2.2	Introducción	43
2.3	Material y Métodos	46
2.3.1	Reactivos	46
2.3.2	Residuos	46
2.3.3	Aislamiento de los microorganismos	46
2.3.4	Análisis filogenético y extracción del DNA de la cepa AS4-A1	47
2.3.5	Condiciones de cultivo	48
2.3.6	Métodos analíticos	49
2.3.6.1	Producción de biomasa y contenido de carbohidratos totales residuales	49
2.3.6.2	Análisis proximal	49
2.3.6.3	Demanda química de oxígeno (DQO)	49
2.3.6.4	Elementos traza.	50
2.3.6.5	Análisis elemental.	50
2.3.6.6	Análisis de ácidos grasos.	50
2.3.6.7	Estadística y cálculos.	51
2.4.	Resultados	52
2.4.1	Caracterización proximal, elemental y químico de los residuos líquidos.	52
2.4.2	Efecto de la composición del medio de cultivo en la producción de biomasa y DHA por tres cepas nativas <i>Thraustochytridae</i> sp. C41, M12-X1 y AS4-A1.	52
2.4.3	Efecto del medio de crecimiento sobre la composición de ácidos grasos (AG) producidos por traustoquitridios nativos.	59
2.4.4	Producción de DHA en medio de cultivo basado en el sub-producto de la fabricación de la cerveza (RC) por la cepa <i>Thraustochytriidae</i> sp. M12-X1.	64
2.4.5	Producción de DHA y ASX en medio de cultivo basado en el Subproducto de la fabricación de la cerveza (RC) por la cepa <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1.	67

2.4.6. Morfología e identificación genética de la cepa <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1	79
2.5 Discusión	81
2.6 Conclusiones	88
3. Bibliografía	90
4. Anexo	108

4.1 Paper 1: Evaluation of liquid residues from beer and potato processing for

the production of docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) by  
native thraustochytrid strains.

4.2. Paper 2: Docosahexaenoic acid (C22: 6n-3, DHA) and astaxanthin production

by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 a native strain with high similitude to  
*Ulkenia* sp: evaluation of liquid residues from food industry as nutrient  
sources.

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de varias especies de traustoquitridios.	26
Tabla 1.2.	Carotenoides y escualeno en traustoquitridios.	32
Tabla 1.3.	Esteroles en traustoquitridios.	34
Tabla 2.1.	Análisis proximal, elemental y químico de los residuos líquidos utilizados para el crecimiento de cepas nativas de <i>Thraustoquitridios</i> . Residuos líquidos del procesamiento de la papa, RP1, RP2; residuo líquido del subproducto de la cerveza, RC.	53
Tabla 2.2.	Efecto de la fuente de carbono sobre la concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa y productividad de DHA ( $P_{DHA}$ ) de las fermentaciones de <i>Thraustochytriidae</i> sp. C41 (3 d, cultivo en matraces erlenmeyer). Residuos líquidos del procesamiento de la papa, RP1, RP2; residuo liquido del subproducto de la elaboración de la cerveza RC; glucosa G; maltosa, M; Almidón, Alm; etanol, Et; extracto de levadura, EL; glutamato monosodico, GMS.	54
Tabla 2.3.	Efecto de la fuente de carbono sobre la concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa y productividad de DHA ( $P_{DHA}$ ) de las fermentaciones de <i>Thraustochytriidae</i> sp. M12-X1 (3 d, cultivo en matraces erlenmeyer). Residuos líquidos del procesamiento de la papa, RP1, RP2; residuo liquido del subproducto de la elaboración de la cerveza RC; glucosa G; maltosa, M; Almidón, Alm; etanol, Et; extracto de levadura, EL; glutamato monosodico, GMS.	56
Tabla 2.4.	Efecto de la fuente de carbono sobre la concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa y productividad de DHA ( $P_{DHA}$ ) de las fermentaciones de <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1 (3 d, cultivo en matraces erlemeyer). Residuos líquidos del procesamiento de la papa, RP1, RP2; residuo liquido del subproducto de la elaboración de la cerveza RC; glucosa G; maltosa, M; Almidón, Alm; etanol, Et; extracto de levadura, EL; glutamato monosodico, GMS.	58

Tabla 2.5.	Perfiles de ácidos grasos producidos por <i>Thraustochytriidae</i> sp. C41 crecida con diferentes fuentes de carbono y EL-GMS (medio de control).	60
Tabla 2.6.	Perfiles de ácidos grasos producidos por <i>Thraustochytriidae</i> sp. M12-X1 crecida con diferentes fuentes de carbono y EL-GMS (medio de control).	62
Tabla 2.7.	Perfiles de ácidos grasos producidos por <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1 crecida con diferentes fuentes de carbono y EL-GMS (medio de control).	63
Tabla 2.8.	Efecto de la concentración del subproducto de fabricación de la cerveza (RC) en las concentraciones de biomasa y DHA, contenido de DHA en la biomasa y Productividad de DHA ( $P_{DHA}$ ) de las fermentaciones por <i>Thraustochytriidae</i> sp. M12-X1 (4 d, matraces erlenmeyer).	66
Tabla 2.9.	Efecto de la concentración de RC en las concentraciones de biomasa, DHA, contenido de DHA en la biomasa y Productividad de DHA de las fermentaciones de <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1.	69
Tabla 2.10	Efecto de la concentración de RC en las concentraciones de biomasa, astaxantina (ASX), contenido ASX en la biomasa y Productividad de ASX de las fermentaciones de <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1.	70
Tabla 2.11	Efecto de las concentraciones de extracto de levadura (EL) y glutamato monosodico (GMS) en medio basado en RC sobre la concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa, y productividades de DHA de fermentaciones de <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1.	73
Tabla 2.12	Efecto de las concentraciones de extracto de levadura (EL) y glutamato monosodico (GMS) en medio basado en RC sobre la concentración de biomasa, contenido de ASX en la biomasa, y productividades de ASX de fermentaciones de <i>Thraustochytriidae</i>	



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Las familias de ácidos grasos n-9, n- 6 y n-3 formados desde sus precursores por una serie de reacciones de desaturación y elongación.	18
Figura 1.2.	Unidad de isopreno.	27
Figura 1.3.	Estructura química del escualeno.	30
Figura 2.1.	Efecto del pH inicial del medio de cultivo RC-EL-GMS en la concentración de biomasa y contenido de DHA en la biomasa de la cepa <i>Thraustochytriidae</i> sp. M12-X1.	65
Figura 2.2.	Concentración de biomasa, AGTs y contenido de DHA en la biomasa de la cepa <i>Thraustochytriidae</i> sp. M12-X1 y DQO durante la fermentación en el medio RC-EL-GMS. pH inicial 6,5; temperatura 25 °C.	67
Figura 2.3.	Efecto del pH inicial del medio basado en RC fermentado por <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1 en la concentración de biomasa y DHA.	68
Figura 2.4.	Perfiles de las (a) concentraciones de biomasa, DHA, ASX y (b) concentraciones de CHT en la fermentación basada en el medio RC por <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1.	71
Figura 2.5.	Perfiles de las (a) concentraciones de biomasa, DHA, ASX y (b) concentración de CHT en la fermentación en el medio basado en RC suplementado con EL y GMS 2 g/L por <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1.	75
Figura 2.6.	Perfiles de las (a) concentraciones de biomasa, DHA, ASX y (b) concentración de CHT en la fermentación en el medio basado en RC suplementado con EL y GMS 2 g/L y vitamina por <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1.	77
Figura 2.7.	Comparación de los principales AGs producidos por <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1 crecido en (1) RC, (2) RC/EL-GMS y (3) RC/EL-GMS más vitaminas B en el momento en que se obtuvo	

la mayor concentración de biomasa.	78
Figura 2.8. Modelo utilizado y flujo de actividades del desarrollo de la investigación propuesta.	80

# CAPÍTULO 1

## REVISIÓN BIBLIOGRAFICA E INVESTIGACIÓN PROPUESTA

### LIPIDOS EN MICROORGANISMOS MARINOS DE LA FAMILIA *Thraustochytriaceae*

#### 1.1 Introducción

Los lípidos son fuentes importantes de energía y materiales para la formación de membranas de microorganismos marinos y poseen diversas funciones en la fisiología y procesos reproductivos de organismos marinos reflejando las condiciones bioquímicas y ecológicas especiales del ambiente marino.

El ambiente marino es una fuente rica en diversidad biológica y química, representada por miembros de todos los *Phyla*. Los microorganismos marinos representan el mayor porcentaje de especies marinas no descritas y constituyen un potencial de nueva fuentes de productos naturales bioactivos (vitaminas, esteroles, terpenos y eicosanoides entre otros) (Burja, 2002; Skulberg, 2000).

Muchos microorganismos sintetizan vitaminas tales como pro-vitamina A ( $\beta$ -caroteno), vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, biotina, etc. (Borowitzka, 1995; Volkman, 2003). Contienen ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), tales como, el ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA), ácido araquidónico (ARA, C20:4 n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, C20:6 n-3) que son importantes para el tratamiento y prevención de variadas enfermedades y también en la nutrición humana y animal.

Debido al contenido de AGPIs, los microorganismos marinos oleaginosos, tales como bacterias, microalgas, hongos y traustoquitridios pueden ser una alternativa interesante al aceite de pescado, usado ampliamente como fuente de estos ácidos.

Las bacterias marinas, producen bajas cantidades de AGPIs tales como EPA y DHA, ácidos grasos ramificados de cadena mediana, y sintetizan ácidos grasos poco comunes y lípidos que no se encuentran en otros sistemas. Relativamente pocas bacterias tienen la capacidad de almacenar lípidos neutros, ya sea como reserva de energía o como almacenamiento de precursores metabólicos. La mayoría de las bacterias almacenan energía en forma de glicógeno, polifosfatos y/o polihidroxialcanatos. Las cepas que producen AGPIs prevalecen en hábitat caracterizadas por bajas temperaturas y alta presión (Allen & Bartlett, 2002; Sijtsma & Swaaf, 2004; Volkman et al, 1998). Varios autores han indicado que la presencia de DHA y EPA en las membranas celulares de bacterias marinas les confiere una mayor resistencia a las bajas temperaturas, a la salinidad y a las altas presiones. Lo anterior se atribuye a la capacidad de los AGPIs de contribuir a la fluidez y a otras importantes propiedades de la bicapa de sus membranas celulares.

A la fecha existen pocos estudios sobre hongos y levaduras marinas debido a que existen pocos trabajos referidos a su aislamiento e identificación. Por el contrario existe una gran información sobre hongos y levaduras terrestres y su capacidad de producción de ácidos grasos. Los hongos almacenan gran cantidad de lípidos, principalmente triacilgliceroles, por ejemplo *Mortierella* spp. es importante por el contenido de AGPI n-3 y n-6 en sus lípidos almacenados. Típicamente más de 40% de su peso seco es triacilglicerol, donde sus cadenas acilo están constituidas por aproximadamente 15% de EPA o 55% de ARA.

Las microalgas usualmente unicelulares o filamentosas comprenden un grupo extremadamente diverso incluyendo el fitoplancton marino, el que provee de una fuente primaria en la cadena alimenticia oceánica. Muchas microalgas son fototróficas, es decir requieren luz como fuente de energía-libre para crecer. Alternativamente, algunas pueden crecer heterotróficamente y la energía metabólica deriva de la asimilación de carbono orgánico y algunas microalgas marinas son capaces de sintetizar *de novo* EPA y/o DHA.

Los traustoquitridios son microorganismos marinos que fueron definidos como microalgas o microorganismos asociados a microalgas. Las primeras investigaciones los clasificaban como hongos por su naturaleza heterotrófica y parecida a los chytridos. Sin embargo, posteriores análisis usando técnicas de biología molecular demostraron que los traustoquitridios no son hongos, en cambio están relacionados con algas heterokonta (Cavalier-Smith et al. 1994; Honda et al., 1999).

Los traustoquitridios han sido estudiados fundamentalmente por su morfología y ecología, alcanzando una mayor relevancia por la capacidad que presentan de producir lípidos especialmente AGPIs del tipo n-3, principalmente DHA. La acumulación de lípidos es un proceso dinámico, el cual depende del organismo, las condiciones de cultivo (pH, temperatura, nutrientes, salinidad y aireación) y la fase de crecimiento. Algunos traustoquitridios pueden ser cultivados para producir alta cantidad de biomasa con cantidades considerables de lípidos ricos en AGPIs; además la producción de AGPIs puede ser modificada manipulando los parámetros físicos y químicos del medio de cultivo (Lewis et al, 2000).

## 1.2 Traustoquitridios

Los traustoquitridios, son microorganismos protistas del dominio Eucariota, Reino Cromista, Phylum Heteroconta (Labyrinthulomycota), Clase Thraustochytridae (*Labyrinthulomycetes*), Orden *Thraustochytriales*, familia *Thraustochytriaceae* que incluye los géneros *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Aurantochytrium* (conocido antes como *Schizochytrium*), *Japonochytrium*, *Althornia*, *Aplanochytrium* (Raghukumar, 2002; Yokohama & Honda, 2007)).

*Labyrinthulomycetes* comprenden dos grupos distintos de estramenopilos marinos heterotróficos, los *Labyrinthulales* (labirintúlidos), *Thraustochytriales* (traustoquitridios), que se distinguen sobre la base de caracteres morfológicos y análisis de filogenia molecular. Los aplanoquitridios y los traustoquitridios poseen esporangio globoso y pared con capa multi-laminar. Sin embargo, las células vegetativas de aplanoquitridios son capaces de movimiento de arrastre usando los filamentos ectoplásmicos que no envuelven totalmente las células, una característica que los distingue de los labirintúlidos quienes se envuelven y se deslizan a través de la red ectoplásmica. Los traustoquitridos son inmóviles, a excepción de la etapa de la espora biflagelada (Leander, *et al.*, 2004).

Los traustoquitridios producen enzimas extracelulares, tales como celulasas, amilasas, xilanases, proteasas, lipasas y pectinasas que son capaces de romper varios tipos de substratos orgánicos complejos. El análisis de la composición química de la pared en las especies *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Japonochytrium* y *Ulkenia* comprende galactosa, xilosa, manosa, glucosa y en algunas especies ocasionalmente rhamnosa y 3-O-Me-galactosa (Chamberlain, 1988; Raghukumar 2002). En las cepas *Schizochytrium aggregatum* y *Thraustochytrium motivum* existe una producción importante de L-galactosa

por hidrólisis de los carbohidratos. La pared celular de *Thraustochytrium* ssp. aparentemente está compuesta por galactano altamente sulfatado (Porter, 1990). Los traustoquitridios por medio de la red ectoplasmática y enzimas altamente degradadoras, penetran substratos refractarios tales como paredes de plantas y juegan un papel importante en la degradación de macrófitas produciendo macromoléculas orgánicas (Santagelo *et al.*, 2000).

Estos microorganismos se han encontrado en diferentes hábitats marinos y estuarios incluyendo algas vivas, detritus marino, agregados de fitoplancton, en invertebrados, en la columna de agua del mar Atlántico, mar del Norte, mar de Arabia, y aguas costeras de Japón (Raghukumar 1980, 2000, 2001, 2002, Naganuma 1998, Bremer 2000). Los traustoquitridios pueden ser aislados de varios substratos y parecen ser abundantes en los sedimentos de ambiente costero y estuarios (Raghukumar & Raghukumar, 1999, Bongiorni, 1998, Bongiorni, *et al.*, 2004).

La habilidad de encontrarse en substratos orgánicos complejos sugiere que estos organismos juegan un rol ecológico importante. A través de la degradación y descomposición, los traustoquitridios promueven el recambio de materia orgánica y establecen interacciones tróficas y competitivas con bacterias, ciliados y otros protistas (Kimura, *et al.*, 1999). Por otro lado los traustoquitridios son capaces de la degradación extracelular y remineralización del material orgánico, ellos utilizan una variedad de compuestos complejos tales como proteínas, lípidos y carbohidratos (Raghukumar, 1992).

De acuerdo a estos antecedentes, algunos residuos industriales podrían ser utilizados como fuente alternativa de carbono y nitrógeno para el crecimiento de estos microorganismos. Uno de los residuos que ha sido estudiado es “okara”, un residuo de la

producción de leche de soya; este residuo contiene un 52% en carbohidratos, 27% en proteínas y 12% de grasas. Es importante indicar, que este residuo en base seca contiene un 47% de carbono y un 4,5% de nitrógeno, además de algunos minerales y vitaminas (Fan, *et al.*, 2001). Las cepas del género *Schizochytrium* que utilizaron este residuo como sustrato presentaron rendimientos de DHA inferiores a los obtenidos desde la fermentación de un medio de cultivo con glucosa, extracto de levadura y sales de mar. Las especies de *Schizochytrium* crecen mejor que *Thraustochytrium* y *Ulkenia* en el medio compuesto por okara. Estos autores indican que estas cepas pudieron crecer en este tipo de medio ya que poseen la capacidad de producir enzimas extracelulares.

### **1.3 Caracterización y reconocimiento**

El análisis molecular de la secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal (18S rRNA) muestra concluyentemente que los traustoquitridios son profundamente divergente de los Oomycetes y cercanos a los labirintúlidos. .

Cepas aisladas de traustoquitridios del género *Ulkenia* poseen esporangio globoso a subgloboso, y desarrollan células ameboïdes (Fan, *et al.*, 2002). Producen una red ectoplásistica y hasta 64 células pequeñas (Raghukumar, 1979). El carácter morfológico de cepas aisladas que fueron asignadas al género *Schizochytrium*, producen zoosporas biflageladas y las células maduras se dividen por repetidas divisiones binarias en forma de diadas, tetradas y clusters (Kamlangdee & Fan, 2003). El patrón de formación de zoosporas de los *Schizochytrium*, es similar con el *Thraustochytrium aureum*, en que las zoosporas se dividen por invaginación centrípeta de la membrana plasmática desde la

región no granular periférica del zoosporangio hacia la región granular central para formar un clúster de zoosporas ordenado radialmente, esto también fue observado en *Thraustochytrium striatum KF-9* (Fan, et al., 2002). Cepas identificadas como *Thraustochytrium benthicola*, presentan talo y poseen un esporangio extremadamente variable que asume formas tales como globosa, subglobosa, piriforme, elípticas y forma de aguja, con una pared fina y cristalina, produciendo un sistema monoaxial de red ectoplásmatica. Durante la liberación de zoosporas, éstas aparecen simultáneamente sobre el esporangio, produciendo más de 120 zoosporas (Raghukumar, 1980, 1988). El modo de producción de zoosporas varía entre géneros y forma un criterio taxonómico importante. El género *Althornia* se parece al género *Thraustochytrium*, pero carece de sistema de red ectoplásrmico. El género *Diplophrys marina* produce células vegetativas elípticas en las que se producen divisiones mitóticas binaria. Las células se mueven por medio de elementos de red ectoplásica el cual, sin embargo no está asociado con sagenogenotosoma en esta especie, pero la secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal (18S rRNA) sugiere que este género es *Thraustochytrium*. Se ha observado en *Schizochytrium limacinum* sp.nov, que células vegetativas liberan células limaciforme ameboidea, las que se desarrollan y liberan ocho zoosporas; siendo informada esta característica sólo para *Ulkenia*, lo que indica que la producción de células ameboidea no es una buena característica a nivel genérico porque ha sido reconocido en varios géneros de traustoquitridios, por lo tanto, se puede considerar este rasgo como característica ancestral del grupo (Honda, et al., 1998, Porter, 1990).

Las características morfológicas de los traustoquitridios, que son usadas generalmente como primer criterio taxonómico son inestables, influenciada por el medio de

cultivo, por lo tanto es necesario realizar análisis de filogenias molecular y análisis químico de la composición de los AG que puedan revelar las verdaderas relaciones evolutivas de traustoquitridios y labirintúlidos (Caverlier-Smith, *et al.*, 1994, Honda, *et al.* 1999). Los perfiles de los AGPIs y carotenoides pueden ser una característica individual de los traustoquitridos y llegar a ser de relevancia filogenética y taxonómica (Yokohama & Honda 2007).

#### **1.4 Hábitat y Ecología**

La distribución de traustoquitridios en la columna de agua de mar ha sido descrita en un área eutroficada semi-cerrada de la isla Seto en Japón, con una densidad de  $2,1 \times 10^3$  a  $5,6 \times 10^4$  células/L. Generalmente, el número de traustoquitridios fue más alto a 1 m de la superficie del agua disminuyendo en el fondo (Naganuma, 1998). El contenido de carbono y nitrógeno para  $524 \mu\text{m}^3/\text{células}$ , de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro fue estimado en  $1,65 \times 10^{-4} \mu\text{g C/célula}$  y  $1,58 \times 10^{-5} \mu\text{g N/célula}$  respectivamente. Para estos microorganismos se encontró que la razón C/N celular de 10,4 fue superior a la conocida para bacterias pelágicas con una razón de C/N 5,6. La biomasa estimada para la población de traustoquitridios varía de 0,41 a 7,44  $\mu\text{g C/L}$  con un promedio de 2,60  $\mu\text{g C/L}$  y 0,039 a 0,71  $\mu\text{g N/L}$  con un promedio de 0,23  $\mu\text{g N/L}$  (Kimura, 1999). La biomasa expresada como carbono de los traustoquitridios corresponde alrededor de 3,4 a 29% de los descomponedores planctónicos totales (bacterias y traustoquitridios). Esto sugiere una contribución significativa de los traustoquitridios a la cadena de alimento microbiano y al ciclo del carbono a través de la producción y degradación orgánica.

Para entender el rol de los traustoquitridios y bacterias en el proceso de descomposición en el mar, del pellet fecal del tunicado *Pegea confoederata* fue examinado encontrándose que contenía un promedio de  $6,58 \times 10^6$  traustoquitridios/g p/p, mientras que el número de bacterias fue alrededor de tres ordenes de magnitud superior. Cuando se compara el pellet fecal en agua de mar superficial no esterilizada incubado a 25° C por 6 días, con el incubado en agua de mar de 100 m de profundidad esterilizada y no esterilizada se encuentra un número superior de traustoquitridios en aguas profundas. Los resultados indican que los traustoquitridios en la columna de agua pueden colonizar pellet fecal. La cepa de traustoquitrido aislado desde pellet fecal fue cultivada en polen de pino, larva de Artemia y caldo de cultivo a 10°C y una presión de 10 Mpa que corresponde a 100 m de profundidad, los resultados sugieren que los traustoquitrido encontrados en tales partículas de materia orgánica puede contribuir activamente en los procesos de descomposición no solo en el agua superficial sino también en condiciones de agua profundas (Raghukumar, 1999).

En el estudio de aguas superficiales de dos tipos, “agua de mar dominante” y “río-afectado”, ubicados en el área de descarga del Río Shimanto Pacífico noroeste, Japón se encontró que la abundancia de los traustoquitridios fue alta en “río-afectado” y baja “en el agua de mar dominante”. Esto sugiere que la abundancia de los traustoquitridios está controlada por el aporte del río en materia orgánica terrígena tal como lignina y celulosa. Esto se apoya en la capacidad de los hongos protistas marinos que sintetizan enzimas celulósicas y digieren materiales celulósicos en la pared celular (Kimura, *et al.*, 2001).

Un estudio de abundancia de traustoquitridios planctónico y bacteriplancton en el mar en la isla Seto, Japón con relación a la concentración de sustrato potencial de

crecimiento, tal como concentración de carbono orgánico disuelto (COD) y carbono orgánico particulado (COP) y de fitoplancton (clorofila *a*), se encuentra que hay una coincidencia entre la mayor abundancia de traustoquitridios y la alta concentración de COP en la Bahía de Hiroshima. En contraste, se encontró un alta abundancia de bacteriplancton en la Bahía de Osaka correlacionada con una alta concentración de clorofila *a*, por lo tanto hay una relación entre abundancia de bacteriplancton y concentración de clorofila *a* en la Bahía (Kimura, *et al.*, 2001), lo que sugiere que los traustoquitridios pueden jugar un rol definido en la dinámica de la materia orgánica particulada (MOP).

## 1.5 Aislamiento y medio de cultivo

Los traustoquitridios son comúnmente aislados desde el agua de mar utilizando polen de pino como cebo y posteriormente en placas con medio de cultivo diseñado especialmente para este tipo de microorganismos. Los dos medios que se emplean y son modificados por diferentes autores especialmente en el contenido de glucosa, es el KMV Agar y el B1 Agar (extracto de levadura (1 g), peptona (1 g), agar (10 g) y agua de mar (Porter, 1990; Bremer, 2000).

La técnica del polen de pino u otro tipo de polen es estándar para aislar chytridos. Una vez que se adiciona el polen a la muestra de agua de mar la colonización por parte de los microorganismos se hace evidente entre 2 y 10 días. Huang, *et al.*, (2001) aisló más de 300 cepas de microorganismos marinos que incluyen cepas de *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Labyrinthula* y otros aislados, usando como cebo polen de pino y los zoosporangios fueron cultivados sobre medio de agar-GPY formado por 2% de glucosa, 1% de polipeptona, 0,5% extracto de

levadura, 1,5% de agar a pH 6,0 con una salinidad equivalente a 50% del agua de mar. Para aislar traustoquitridios desde hojas caídas de *Kandelia candel* (Fan, *et al.*, 2002) las hojas son cortadas y lavadas con agua de mar natural estéril al 15% suplementada con 1 mg/mL de penicilina G y sulfato de estreptomicina para evitar crecimiento de bacterias. Luego son sembradas en medio de agar-extracto de levadura y peptona (YEP) compuesto por 1 g de extracto de levadura, 1 g de peptona micológica, 13 g de agar y 1 L de agua de mar natural al 15 %.

Estos microorganismos tienen la capacidad de crecer y producir una serie de metabolitos en sistemas cerrados con medios de cultivo variados. Diferentes investigadores han indicado el grado de asimilación de otras fuentes de carbono alternativas a la glucosa, por este tipo de microorganismos. El estudio más completo fue realizado por Bahnweg en 1979 quien utilizó diferentes especies de traustoquitridios demostrando que éstos tienen la capacidad de utilizar un amplio rango de fuentes de nitrógeno orgánico y compuestos de carbono para su nutrición. Las fuentes de carbono que soportan un buen crecimiento incluyen a D-glucosa, celobiosa, maltosa, almidón soluble, dextrina, laminarina y glicerol. Otros azúcares, glicósidos, y ácidos orgánicos fueron utilizados en menor grado por pocas especies. Esto indica que los traustoquitridios están bien provistos de un pool de enzimas para descomponer una amplia variedad de compuestos de origen terrestre y marino.

Iida, *et al.* (1996), describen las condiciones para la producción de biomasa, lípidos totales y DHA para *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304, utilizando como medio optimizado glucosa (10 g), glutamato de sodio (25 g), extracto de levadura (1 g), peptona (1 g), vitaminas, elementos trazas, agua de mar artificial al 50% y pH 5,5. Yokochi *et al.* (1998), optimizan la producción de DHA en *Schizochytrium limacinum* SR21. El

rendimiento máximo de DHA de 4,20 g/L y 4,15 g/L se obtiene en ambos medio glucosa (9%) y glicerol (12%), 5 días de cultivo, con licor de maíz y concentración de sales correspondiente al contenido de sales del agua de mar. El contenido de ácidos grasos totales (AGTs) aumenta al disminuir la concentración de la fuente de nitrógeno. Los autores atribuyen parte del aumento del rendimiento a la alta tolerancia de la cepa a concentraciones alta de fuente de carbono. La cepa *Schizochytrium limacinum* muestra crecimiento pobre en di y polisacáridos mientras *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum* y *Schizochytrium aggregatum* crecen bien en maltosa y almidón (Ward & Singh, 2005). El crecimiento de *Thraustochytrium aureum* fue inhibido a concentraciones de glucosa mayores a 10 g/L. Se informa que el perfil de asimilación de compuestos de carbono es comparativamente estable entre las mismas especies en traustoquitrídos, sin embargo *Schizochytrium limacinum* no utiliza maltosa, celobiosa y almidón como lo hacen todas las cepas de *Schizochytrium aggregatum*; esta diferencia en la asimilación de compuesto de carbono permite distinguir *Schizochytrium limacinum* de *Schizochytrium aggregatum* (Honda, et al., 1998).

Bowles, et al. (1999) evalúan 57 traustoquitrídos aislados de tres localidades diferentes. La producción de DHA fue estimulada por una alta razón C/N. La máxima concentración de biomasa, contenido de lípido en la biomasa, contenido de DHA en los lípidos y producción óptima DHA se obtuvo en cultivos de 107 h en un medio compuesto por 40 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de sulfato de sodio. Otras cinco cepas de *Schizochytrium*, N-1; N-2; N-5; N-6 y N-9 fueron aisladas y cultivadas en un medio que contenía 60 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura y 1,0 L de agua de mar artificial al 15%, pH inicial 6,0 con agitación por 52 h a 25°C. Las producciones de la

biomasa de las cinco cepas va desde 10,8 a 13,2 g/L y la salinidad óptima fue observada entre 25,0-30,0 %. (Kamlangdee & Fan, 2003). En otra investigación en la que se optimiza la producción de DHA por una cepa de *Schizochytrium* (Yaguchi et al. 1997), indica una máxima concentración biomasa de 48,1 g/L y 13,3 g /L de DHA producido en cultivos de 96 h, en un medio de cultivo compuesto por 120 g/L de glucosa 1,4 g/L de licor de maíz, 4,0 g/L de sulfato de amonio, 3,0 g/L de fosfato diácido de potasio y agua de mar artificial al 50%. Es importante indicar que estos autores realizaron todas sus experiencias con una relación C/N de 53. El mayor impacto de utilizar diferentes concentraciones de glucosa (60, 80, 100, 120, 150 g/L) fue en la concentración de biomasa la que se incrementó desde 21,9 a 59,2 g/L. En cambio el contenido de lípidos (67,6 a 82,6 %) y de DHA (33,3 a 37,3 %) fueron menos afectados por concentraciones altas de glucosa. Un estudio realizado sobre el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de DHA por la cepa *Schizochytrium* sp. S31 (Wu, et al. 2005), muestra que la condición de cultivo con mayor productividad de DHA corresponde al medio de composición 20 g/L de glucosa y 4 g/L de extracto de levadura en 96 h de incubación a un pH inicial de 7,0.

Otros estudios realizados por Raikar, *et al.* (2001) indican la capacidad de algunas cepas de traustoquitridios para degradar una alta proporción de hidrocarburos (alquitrán) desde sedimentos, acompañado por una disminución del nitrógeno orgánico. Lo anterior confirma la capacidad de estos tipos de microorganismos de degradar material recalcitrante.

En el caso de las fuentes de nitrógeno inorgánicos, Yokochi, *et al.* (1998) realizaron pruebas con cinco tipos diferentes de sales nitrogenadas orgánicas e inorgánicas adicionando extracto de levadura y licor de maíz al medio basal, como resultado se obtuvo que ambas fuentes de nitrógeno nitrato y amonio no afectaron mayoritariamente la

concentración de biomasa. No obstante el acetato de amonio presentó el mayor rendimiento de DHA. Es importante indicar que al comparar las fuentes orgánicas con las inorgánicas se lograron concentraciones de biomasa superiores a las obtenidas al usar fuentes de nitrógeno orgánico y niveles muy parecidos de concentraciones de DHA. Estos autores estudiaron el efecto del acetato de amonio, como fuente de nitrógeno, reportando que para una concentración de 1,23 g/L se lograba un máximo de 3 g/L de DHA y la composición de los ácidos grasos no era afectada por la cantidad de acetato de amonio utilizado. Es importante indicar que no existe ningún otro estudio que utilice el acetato de amonio como fuente de nitrógeno, ya que todas utilizan el extracto de levadura o el licor de maíz.

En cuanto a la salinidad, los traustoquitrídos prefieren salinidades de 20 - 34 %, tienen un requerimiento absoluto por el ion  $\text{Na}^+$  que no es reemplazado por  $\text{K}^+$  y se han aislado desde salinidades tan bajas como 12 % (Raghukumar, 2002). Yokochi et al. (1998), optimizan la producción de DHA en *Schizochytrium limacinum* SR21 utilizando el medio glucosa (9%) y glicerol (12%) en cultivos de 5 días, con licor de maíz y concentración de sales entre 50 y 200 % del contenido de sales del agua de mar. Esta cepa también crece a salinidad cero, aunque a una velocidad de crecimiento baja. Esta cepa contrasta con *Thaustochytrium aureum*, la cual es completamente inhibida por salinidad de 0 y 200% de agua de mar.

## 1.6 Biosíntesis de los ácidos grasos

### 1.6.1 Ácidos grasos saturados

Los procesos de biosíntesis de ácidos grasos están bien estudiados y se conoce que son catalizados por la enzima sintetasa ácido graso (FAS). En animales, esta es una proteína

multifuncional que contiene todas las actividades catalíticas requeridas, mientras que plantas y bacterias utilizan un acoplamiento de enzimas separables. La síntesis de ácidos grasos se inicia con la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA, una reacción irreversible ATP-dependiente que es catalizada por acetil-CoA carboxilasa. La acetil-CoA y malonil-CoA no están involucrados en el paso de la condensación se convierten en enzimas tioester, el malonil-ester por medio de una proteína portador de acil (ACP) creando malonil-ACP ( $\text{HCO}_2\text{CH}_2\text{CO-S-ACP}$ ). Sucesivas moléculas de malonil-CoA son agregadas a la primera molécula de acetil-CoA en una secuencia de reacciones catalizadas por un complejo de enzimas multifuncional, la sintetasa ácido graso (FAS).

Casi todos los sistemas biológicos, incluyendo microorganismos, insectos, plantas superiores y animales, son capaces de sintetizar ácido grasos *de novo* desde acetato con el ácido oleico (18:1 n-9) como producto principal. La biosíntesis comienza con la carboxilación del acetil-CoA para formar acetato o piruvato por la acción de enzimas glicolíticas. El acetil-CoA se convierte a malonil-CoA, una reacción que involucra ATP,  $\text{CO}_2$  (como bicarbonato,  $\text{HCO}_3^-$ ) y la coenzima biotina como portador de  $\text{CO}_2$  y que se utiliza para realizar una reacción de condensación de Claisen para extender el grupo acil hasta el ácido esteárico (18:0) y a través de la desaturación al ácido oleico (Dewick, 2002).

### **1.6.2 Ácidos grasos insaturados**

Los ácidos grasos insaturados pueden originarse por más de una ruta biosintética, pero en muchos organismos el mecanismo común es por desaturación del correspondiente ácido alcanoico (ácido graso saturado precursor), por medio del cual las enzimas desaturasa insertan dobles enlaces en localizaciones específicas de la cadena del ácido graso y un

sistema de elongamiento que extiende la cadena incrementando su longitud en dos carbonos.

Muchos organismos eucariontes poseen una  $\Delta^9$  desaturasa que introduce un doble enlace *cis* en un ácido graso saturado (preferentemente palmitato, 16:0, pero también puede usar estearato, 18:0), requiriendo O<sub>2</sub> y los cofactores NADPH o NADH. El mecanismo de desaturación no involucra ningún intermediario hidroxilado en C-9 o C-10, y el requerimiento de oxígeno se debe a que actúa como un aceptor de una cadena de transporte de electrón. Un tioester estearoil (C18) es el substrato habitual dando un derivado oleoil. El éster coenzima A sería utilizado por enzimas animal y de hongos y el éster ACP sería utilizado por las plantas.

El ácido oleico (18:1 n-9) es además desaturado por una  $\Delta^{12}$  desaturasa para formar ácido linoleico (18:2 n-6) y una  $\Delta^{15}$  desaturasa para formar ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3). La  $\Delta^6$  desaturasa puede actuar sobre el ácido linoleico para formar el ácido  $\gamma$ -linolénico (ruta  $\omega$  6) o sobre el ácido  $\alpha$ -linolénico para formar el 18:4 n-3 (ruta n-3). Por lo tanto, las familias de ácidos grasos n-9, n-6 y n-3 son formadas desde sus precursores por una serie de reacciones de desaturación y elongación (Fig. 1.1). Los tres ácidos grasos, ácido oleico, ácido linoleico (LA) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) compiten cada uno por la  $\Delta^6$  desaturasa. La afinidad de las enzimas con el substrato y la cantidad de substrato disponible determina cual ruta metabólica es predominante. Generalmente, la primera  $\Delta^6$  desaturación es la etapa limitante y el ALA tiene alta afinidad por  $\Delta^6$  desaturasa seguido por LA y el ácido oleico (Wen & Chen, 2003; Certik & Shimizu, 1999). La síntesis del ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6) y del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) en humanos, comienza

predominantemente con precursores como el ácido linoleico y el ácido linolénico respectivamente, e involucra en forma alternada reacciones de desaturación y elongación en el ácido graso, mediadas por enzimas específicas desaturasa y elongasa. La producción del ácido docosahexaenoico (DHA 22:6 n-3) involucra una doble elongación de 20:5 n-3 a 22:5 n-3 y luego a 24:5 n-3 seguido de una  $\Delta^6$  desaturación a 24:6 n-3 y una ciclo beta-oxidación (en peroxisomas) para producir el 22:6 n-3 (Luthria, *et al.*, 1996; Qiu, 2003).

Una nueva ruta biosintética anaeróbica, que no depende del sistema ácido graso desaturasa/elongasa, que utiliza un mecanismo sintetasa poliketido (PKS) para producir 20:5 n-3 y 22:6 n-3 ha sido caracterizada recientemente (Sayanova & Napier, 2004). Esta nueva ruta involucra un sistema especializado PKS que ha sido establecido para la producción de AGPIs en microorganismos marinos procariontes y eucariontes. El sistema PKS utiliza las mismas cuatro reacciones básicas de FAS (sintetasa ácido graso), pero a menudo el ciclo se reduce para producir una cadena de carbono con muchos hidroxilo, ceto y los dobles enlaces C=C. Puesto que el ciclo PKS agrega unidades de 2-C a la cadena y los dobles enlaces en EPA y DHA son localizados en el tercer carbono, se ha sugerido que esto se lograría por generación de dobles enlaces con  $\Delta^{14}$  y  $\Delta^8$  en EPA 2-trans, el que luego es convertido a 2-cis por isomerización y que simultáneamente se mueve a la posición 3,4 y la elongación del ácido graso por una enzima aun no identificada, tal vez representada por uno de los dominios no asignada de la proteína PKS (Ratledge, 2004; Ward & Singh, 2005).

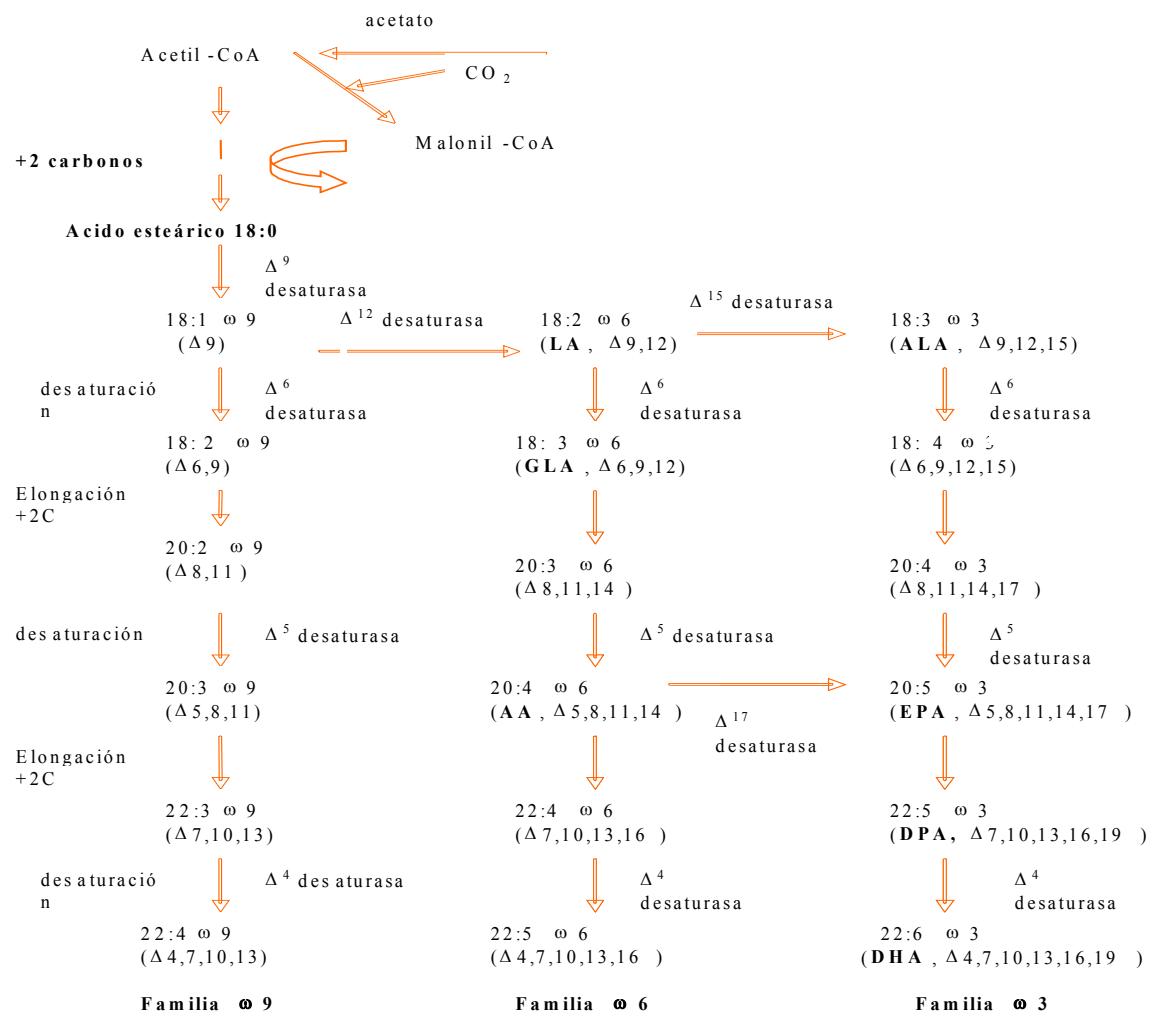


Figura 1.1. Las familias de ácidos grasos n-9, n-6 y n-3 formados desde sus precursores por una serie de reacciones de desaturación y elongación.

## **1.7 DHA y otros ácidos grasos en traustoquitridios**

Los traustoquitridios son conocidos porque contienen un alto contenido celular de AGPIs, DHA y ácido docosapentaenoico (DPA, C20:5 n-3 ó n-6). Estos ácidos grasos son esenciales para muchos animales marinos que los obtienen a través de la dieta.

En estudios realizados por Bowles, *et al.* (1999) con cepas de traustoquitridios aislados de tres ambientes climáticos distintos la máxima concentración biomasa, contenido de lípido en la biomasa, contenido de DHA en los lípidos fueron de 14 g/L, 78% (p/p), 25% (p/p), respectivamente, la producción óptima de DHA fue 2,17 g/L después de 107 h de cultivo. El porcentaje de DHA en los ácidos grasos totales (AGT) para los aislados de la localidad subtropical presentó variaciones en el rango de 4-34% (media 16,6%) de ácidos grasos (AG), los de temperatura templada de 2-39,6% (media 13,7%) y los de temperatura fría 17-47% (media 35,9%). El rango para los valores de lípidos totales en células secas para los subtropicales fue 1,8-37,3%, p/p. Por el contrario, la menor cantidad de lípidos totales extraídos fue de los de temperatura fría 2,0-7,1% p/p y de los de temperatura templada 1,6-13,6% p /p. El DHA representa el componente mayoritario del contenido de AGPIs, particularmente aquellos producidos por microorganismos provenientes de temperatura fría. Todos los traustoquitridios sintetizan AA en variadas cantidades. Sin embargo, EPA está presente en todos los aceites en concentraciones bajas desde 0,2-0,6% p/p de células seca de traustoquitridios.

En un medio optimizado fue cultivada la cepa *Thraustochytrium aureum* ATTCC 34304, obteniéndose 5,7 g/L de biomasa y 0,46 g/L de lípidos totales con 40% de DHA. Los lípidos obtenidos están formados por 90,1% de lípidos neutrales y 8,9% de lípidos polares. El contenido de triacilglicerol de los lípidos neutrales fue 86,2% y los componentes

principales de los lípidos polares fueron dos fosfolípidos, fosfatidilcolina (49% de los lípidos polares) y fosfatidiletanolamina (9% de los lípidos polares). La composición y contenido porcentual de los ácidos grasos en las fracciones de lípidos neutrales y lípidos polares fueron C16:0 (25% de contenido), C18:0 (~2%), C18:1 (15%), C18:2 (~2%), C20:4 (6%), C22:5 (10%) y C22:6 (40%) (Iida, *et al.*, 1996).

Wu, *et al.*, (2005) al evaluar el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de DHA, el perfil de ácidos grasos y los ácidos secretados en el medio de cultivo por el microorganismo oleaginoso, *Schizochytrium* sp. S31, encontraron que éste acumula lípidos que representan más de un 40% de la biomasa (59,3 mg/g) y que contiene un 13% (p/p) de DHA (288,6 mg/L) de los lípidos. La concentración del ácido graso C16:0 permanece constante y los otros ácidos grasos son sintetizados en pequeñas cantidades. Las máximas concentraciones de biomasa y DHA fueron de 48,1 y 13,3 g /L, respectivamente.

En *Schizochytrium* sp. SR21 se obtuvo 3,3 g DHA/L/d, 77,5% de lípidos base células seca y el contenido de DHA fue de 35,6% de los ácidos grasos totales. La composición de los lípidos en la fase estacionaria de crecimiento fue de alrededor del 95% de lípido neutral y 5% de lípido polar. Los lípidos neutrales estuvieron compuestos por un 35% de DHA y 6% de DPA. Por otro lado, los lípidos polares estuvieron compuestos por 63,5% de DHA y 24,7% de DPA (Yaguchi, *et al.*, 1997). Yokochi, *et al.*, (1998) estudiaron diferentes condiciones de cultivo para la cepa *S. limacinum* SR21. El contenido de DHA obtenido fue del 43,1%. El contenido de ácidos grasos saturados (C14:0, C15:0, C16:0 y C18:0), principalmente ácido palmítico (C16:0), varió desde 45% a 60% y el resto fue principalmente DHA y DPA. El contenido de EPA y AA fueron menos de 0,1% y 0,8% respectivamente.

En cinco cepas de *Schizochytrium* la N-1; N-2; N-5; N-6 y N-9, el ácido pentadecanoico (15:0), ácido palmítico (16:0) y el DHA fueron los ácidos grasos predominantes. Estas cepas también produjeron cantidades significativas de ácido docosatetraenoico (DTA 22:4) y se observó cantidades trazas de ácidos grasos insaturados del tipo C18 (Kamlangdee & Fan, 2003). Los perfiles de ácidos grasos de las cinco cepas de *Schizochytrium* fueron caracterizados por la presencia del ácido graso de cadena saturada impar el ácido pentadecanoico (C15:0), con un porcentaje relativamente alto de los ácidos grasos totales (23,9-26,7%). En todas las cepas se encontró un ácido graso saturado de cadena par, el ácido palmítico (C16:0) con 19,7-29,4%, y estuvieron ausentes en todas las cepas, los ácidos grasos de 18 carbono, especialmente ácidos oleico y linoleico. Por último, los niveles de AGPI fueron altos en muchas cepas con cantidades de DHA de 30,3-36,1%. Al investigar la cepa *Thraustochytrium sp ATCC 26185* para determinar su potencial en producción de DHA y composición de lípidos, se encuentra que las células proveniente de cultivos líquidos contenían un 32% (p/p) de lípidos con un 18% de lípidos no saponificables. El contenido de AGs (14:0 y 16:0) corresponde a más de un 59% de los AGT y el DHA fue más del 25% después de seis días de incubación (Weet, 1997).

Un estudio realizado por Lewis, *et al.*, (2000) evaluó las cepas ACEM 6063 y ACEM A, aisladas desde sedimentos marinos costero en el sudeste de Tasmania (Australia) tentativamente identificadas como traustoquitridios. La cantidad de AGT recuperados por transesterificación directa en la cepa ACEM 6063 fue de 403 mg/g peso seco, cuya composición fue 47% de ácidos grasos saturados, 1,4% de ácidos grasos monoinsaturados y 51% de AGPIs. Los ácidos grasos principales fueron C14:0 (48 mg/g peso seco), C15:0 (4,8 mg/g peso seco), C16:0 (130 mg/g peso seco), C18:0 (4,8 mg/g peso seco), C20:4 n-6

(4,8 mg/g peso seco), C20:5 n-3 (6,0 mg/g peso seco), C22:5 n-6 (45 mg/g peso seco), C22:6 n-3 (131 mg/g peso seco). Para la cepa ACEM A la cantidad de AGT recuperados a los 5 días de cultivo fue de 181 mg/g peso seco formado por un 37% de AGs, 21% de ácidos grasos monoinsaturados y 42% de AGPIs. Los ácidos grasos principales fueron C14:0 (6,6 mg/g p/p), C16:1 n-7 (4,0 mg/g p/p), C16:0 (33 mg/g p/p), C18:2 n-6 (14,0 mg/g p/p), C18:1 n-9 (24,0 mg/g p/p), C18:0 (9,0 mg/g p/p), C20:4 n-6 (3,6 mg/g p/p), C20:5 n-3 (17,0 mg/g p/p), C20:2 n-6 (6,5 mg/g p/p), C22:5 n-3 (7,1 mg/g p/p), C22:6 n-3 (7,6 mg/g p/p).

Jiang, *et al.*, (2004) estudiaron la composición de ácidos grasos y contenido de escualeno en tres cepas de *S. mangrovei*, FB1 FB2 y FB3 y dos especies comerciales. Para estas cepas se encontró que la proporción de ácidos grasos, especialmente el porcentaje de AGPIs en los ácidos grasos totales era superior en la fase estacionaria (temprana y tardía) que en las otras fases de crecimiento. El contenido de los principales ácidos grasos saturados (AGSs), C14:0 y C16:0 disminuye ligeramente con el aumento del tiempo de cultivo (tres a cinco días). El contenido total de ácidos grasos también disminuyó con la edad del cultivo. La disminución de los AGSs fue acompañada por un leve aumento en ácidos grasos insaturados y proporción de DHA. La proporción de DHA y el grado de ácidos grasos insaturados de las tres especies *S. mangrovei* fue mucho mayor que las otras dos especies comerciales, presentando una proporción más alta de DHA y un grado mayor de ácidos grasos insaturados en la cepa *S. mangrovei* (FB1) cuando fue cultivada por cinco días.

Otras cepas productoras de AGPI fueron aisladas desde agua de mar de la costa del mar de isla de Seto y alrededor de la isla de Iriomote, Japón. Las cepas que produjeron

cantidades significativas de DHA fueron divididas en cuatro tipos de acuerdo a los perfiles de AGPI que presentaron (DHAA/DPA, DHAA/DPA/EPA, DHA/DPA/EPA/AA y DHAA/DPA/EPA/AA + C22:4 n-6). Se seleccionó la cepa denominada *KK17-3* para otros experimentos la que presentó el perfil DHA/DPA/EPA/AA similar a *T. aureum* ATCC 28211. El contenido de AGPI fue 76,1% de los AGT y la razón de DHA/AGT fue superior a un 52,1%. Los perfiles de AGPI no cambian en el rango de salinidad 50–200%, la proporción constante de los AGPI puede ayudar a mantener las funciones fisicoquímicas de la membrana lípidica en un amplio rango de presión osmótica (Huang, *et al*, 2001). Con respecto a su comportamiento utilizando glucosa como fuente de carbono y energía se obtuvo 5,5 g/L de biomasa, 545 mg/L de AGT y 145 mg/L de DHA.

Otro estudio con cepas nuevas y cepas preservadas en laboratorio las que fueron analizadas de acuerdo al perfil lipídico, todas ellas a excepción de dos produjeron una cantidad significativa de DHA comprendida entre un 22% a 53% de los AGT. Dos de las cepas aisladas, denominadas A5-20 y KH105 además del DHA acumularon DPA, al igual que *Schizochytrium. limacinum* (12,4%; 7,7% y 6,7% respectivamente) del total de ácidos grasos. Analizando los perfiles de AGPI de las distintas cepas en este estudio, se forman cinco perfiles diferentes: DHA/DPA; DHA/DPA/EPA; DHA/EPA; DHA/DPA/EPA/AA; DHA/DPA/EPA/AA/ácido docosatetraenoico (DTA). Los diferentes medios de cultivo y la temperatura de cultivo muestran poco efecto sobre los perfiles AGPI en los nuevos aislados, sin embargo temperaturas bajas, 15 °C aumenta el contenido total de AGPI de cadena larga en la fracción de ácidos grasos al compararlo con la temperatura normal, 28°C. Todo esto podría indicar la estabilidad de los perfiles de AGPI C20 y C22 validando como una característica efectiva para este grupo de traustoquitridos (Huang, *et*

*al.*, 2003). Burja et al, (2006) informan un nuevo perfil de AGPI DHA/EPA/AA representando a un sexto perfil diferente a los propuestos anteriormente. Sin embargo, además encontraron que los perfiles de AGPI podrían incluso ser más diversos cuando los microorganismos son cultivados en placas de agar que los que presentan en cultivo líquido.

En un estudio comparativo de diferentes medios de cultivo, los perfiles de ácidos grasos totales de nueve cepas cultivadas en glucosa o en residuo de leche de soya mostraron que muchas cepas tienen un nivel relativamente alto de ácidos grasos saturados (AGS) de cadena par, principalmente ácido palmítico (16:0; 6,7-47,4%); también poseen un ácido graso saturado de cadena impar (15:0, 3,3-38,9%), en muchas de las cepas estuvieron ausentes los ácidos grasos de 18 carbono especialmente ácido oleico y linoléico a excepción de *Ulkenia sp KF13*, y por último los niveles de AGPI fueron altos en la mayoría de las especies con un contenido de DHA de 4,0-40,5% en la biomasa en un medio con glucosa. Todas las cepas estudiadas utilizaban el residuo de leche de soya para crecer y producir DHA después de 4 días de fermentación. La biomasa producida por la cepa *Schizochytrium mangrovei* cultivada en leche de soya contenía DHA en el rango 4,7 a 9,4 mg/g y se detectó EPA en *Thraustochytrium striatum* KF9 y *Ulkenia sp.* KF13, cuyo rendimiento fue de 2,4 y 1,5 mg/g, respectivamente y la cepa *Schizochytrium mangrovei* no produce EPA en el medio basado en residuo de leche de soya “okara”. Los perfiles de ácidos grasos del control okara no fermentado (sin microorganismo), antes o después de 4 días de incubación, está compuesto principalmente de ácido palmítico (16:0) y ácidos grasos de C18 como el constituyente mayor el ácido linoléico (18:2). No fueron detectados AGPI de cadena con 20 carbono o superior. Dos cambios importantes en los perfiles de ácido graso fueron observados después de la fermentación con “okara”: a) fueron

detectados AGPI, especialmente DHA variando desde 0,5% a 4,9% del total de ácidos grasos; b) el contenido de ácido graso insaturado de la serie de C18, a saber los ácidos linoléico y linolénico, fueron significativamente menor que los contenidos en okara no fermentado. La biomasa del okara fermentado después de 4 días de incubación fue similar a los controles de okara no fermentado, pero se observa pérdida de peso cuando se fermenta con *Thraustochytrium striatum* KF9 y *Ulkenia sp.* KF13. La producción de DHA en los traustoquitridios fermentado en okara fue más bajo comparado con el medio glucosa, extracto de levadura. Esto se podría explicar por el efecto de azúcares simples, tal como la glucosa que son más rápidamente utilizada que los polímeros recalcitrantes, tal como la celulosa presente en el okara para la transformación en los traustoquitridios (Fan, *et. al.*, 2001).

Cepas de traustoquitridios colectadas en seis sitios en agua y sedimentos en la costa de Goa, lugar expuesto a la contaminación por aceite debido a la presencia de botes en muelles y puertos fueron aislados y cultivados en diferentes medio. El rango de abundancia de traustoquitridios en muestras de agua fue desde 50 a 750 número/L y en muestra de sedimentos el rango va desde 1 a 30 número/L. La adición de aceite crudo a tubos de aislamiento con traustoquitridos resulta un menor número de traustoquitridios en dos sitios de muestreos. Cuando el aceite crudo fue agregado a los tubos de aislamiento con traustoquitridos proveniente de sedimentos un números mucho mayor fueron recuperados.

**Tabla 1.1 Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de varias especies de traustoquitridios**

Ácidos grasos	Contenido de ácido graso del total de lípidos (%)							
	<i>S. limacinum</i> SR2I*	<i>T. aureum</i> ** KF9***	<i>T. striarum</i> KF9***	<i>T. roseum</i> 28210****	<i>Schizochytrium.</i> sp. ATCC20889*****	<i>S. mangrovei</i> FB3*****	<i>S. mangrovei</i> FB1*****	<i>Ulkenia</i> sp. KF13***
12 : 0					0,88	0,9	0,82	
13 : 0					0,78	0,83	0,79	
14 : 0	3,9	3	0,0	3,2	11,4	4,47	4,045	3,7
14:1								
15 : 0	2,5		7,9		3,74	1,67	1,05	10,7
15 : 1		8						
16 : 0	54,5		6,7	7,8	0,61	45,1	40,36	22,8
16 : 1 n-7					12,0			
17 : 0	1				0,55	0,4	0,58	
18 : 0	1,1	16	0,0	4,2	7,11	1,23	1,26	11,7
18 : 1 n-7								
18 : 1 n-9	0,1	2	0,0	16,0	4,74	1,00	0,43	18,2
18 : 2 n-6	0,1	2	0,0	2,2				4,3
18 : 3 n-3			0,0	1,5	0,34	0,45	0,47	0,5
18 : 3 n-6								
18 : 4 n-3								
20 : 3 n-6					0,84	0,51	0,51	
20 : 4 n-3		3						
20 : 4 n-6	0,1		0,0	3,0	0,58	0,57	0,63	1,7
20 : 4 n-7								
20 : 5 n-3	0,4		23,3		0,84	0,47	0,45	2,3
22 : 4 n-6			8,6					1,4
22 : 5 n-6	6,0				9,70	7,73	9,06	
22 : 6 n-3	30,5	52	36,6	42,3	26,25	34,9	39,14	4,0

Yokochi et al., (1998)\*; Sijtsma & de Swaaf (2004)\*\*; Fan, et al., (2001)\*\*\*; Singh & Ward (1998);\*\*\*\* Jiang, et al., (2004)\*\*\*\*\*.

Tres cepas de traustoquitridos aislados en sedimentos fueron cultivados en un medio que contenía sedimento y alquitrán. El resultado fue una marcada disminución en la concentración de la fracción extraíble de alquitrán donde una de las cepas muestra un alto grado de reducción, igual al 71%. El análisis de gravimetría y cromatografía gaseosa revelan que los traustoquitridios remueven de 15 -30% del alquitrán incorporado en el

caldo nutritivo en 7 días. Los hidrocarburos mayores a C<sub>20</sub> fueron removidos en mayor cantidad que los menores a C<sub>20</sub> (Raikar & Raghukumar, 2001).

## 1.8 Otros lípidos producidos por traustoquitridios

### 1.8.1 Carotenoides

Los carotenoides pertenecen a la clase de los polienos, es decir, están formados por largas cadenas con doble enlace conjugados, cuya abundancia explica el color intenso de éstos y están construidos con base a unidades de isopreno (Fig. 1.2)

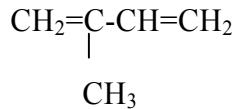


Figura 1.2 Unidad de isopreno

Los carotenoides son pigmentos terpenoides de gran interés en muchas disciplinas científicas por su amplia distribución, diversas funciones y propiedades. Resultados con evidencias epidemiológicas y experimentales sugieren que los carotenoides en la dieta inhiben el comienzo de muchas enfermedades tales como arteriosclerosis, cataratas, esclerosis múltiple y el cáncer, donde se piensa que los radicales libres juegan un papel importante en la iniciación. Algunos carotenoides importantes de utilidad comercial producidos por microorganismos son el licopeno ( $\psi$ ,  $\psi$ -caroteno),  $\beta$ -caroteno ( $\beta,\beta$ -caroteno), ASX (3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta$ -4,4'-diona), luteína (3R,3'R,6'R- $\beta,\xi$ -caroteno-3,3'-diol) y zeaxantina (3R,3'R- $\beta,\beta$ -caroteno-3,3'-diol) (Bhosale, 2004). El  $\beta$ -caroteno es un pigmento de demanda creciente y con amplia variedad en aplicaciones en el mercado como agente colorante para alimentos, como provitamina A (retinol), como aditivo en cosmética,

preparación multivitamina y en la última década como producto de alimento para la salud bajo la definición de antioxidante (Edge et al., 1997).

Los carotenoides son biosintetizados por plantas, algas, hongos y bacterias. En estos organismos parecen jugar numerosos roles, especialmente en plantas como almacenadores de luz y para proteger a la célula del daño oxidativo. Un número de carotenoides, tales como  $\beta$ -caroteno, astaxantina, y licopeno son buenos antioxidantes en la fase lípido en su función como atrapadores de radicales libre o quenchers de oxígeno singlete. Se sabe que el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) daña el ADN y es mutagénico. Los carotenoides pueden prevenir la producción de reacciones en cadena de radicales libres iniciada por la degradación de AGPIs y así previenen la degradación acelerada de los lípidos de membrana.

El uso del pigmento natural astaxantina es de gran interés en la industria química, industria farmacéutica y alimentaria, debido a sus propiedades antioxidantes (Yamane et al. 1997). En la acuicultura, es empleada como una fuente de pigmentación natural y suplemento dietético para la trucha y el salmón (An et al. 1991).

*Dunaliella* (alga verde) y *Blakeslea trispora* (hongo) son en el presente las fuentes comerciales de  $\beta$ -caroteno y ASX es producida por *Haematococcus pluvialis* (Dufosse et al., 2005).

Los traustoquitidios son una fuente potencial de carotenoides tales como  $\beta$ -caroteno y carotenoides oxigenados como xantofilas (ASX y cantaxantina). Burja et al. (2006) postulan que probablemente su producción sirva para prevenir la oxidación de sus aceites de reserva.

También se ha informado la presencia de pigmentos carotenoides, tales como ASX, zeaxantina, cantaxantina,  $\beta$ -caroteno, equinanona y fenicoxantina en estos microorganismos (Carmona et al. 2003, Aki et al. 2003, Armenta et al. 2006, Burja et al. 2006) (Tabla 1.2).

Considerando el potencial biosintético de los traustoquitridios para producir dos compuestos igualmente importantes, AGPIs y carotenoides, una cepa de color naranja fue estudiada para identificar los carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta cepa denominada *Thraustochytrium* CHN-1, fue aislada desde muestras de agua de mar colectadas en la costa de Nagahama en el mar de la isla Seto de Japón, se encontró que contiene el carotenoide ASX como el pigmento principal, además fueron identificados la equinenona, cantaxantina, foenicoxantina y  $\beta$ -caroteno. El nivel de carotenoides totales extraídos se encuentra que aumenta con la edad del cultivo (Carmona et al., 2003). El contenido de pigmentos está asociado al crecimiento de la célula, el máximo crecimiento en la fase estacionaria es alcanzado después de ocho días de incubación, además la incubación hasta 14 días no incrementa la biomasa celular o el contenido de los carotenoides totales extraídos. El contenido de  $\beta$ -caroteno en la cepa declina a los 6 días de cultivo y el contenido de ASX aumenta. La cantidad total de carotenos fue sustancialmente baja durante la fase estacionaria o tardía y el contenido de xantofilas fue mayor. Resultados preliminares demuestran que (3S,3'S) astaxantina es sintetizada en *Thraustochytrium* CHN-1 desde  $\beta$ -caroteno vía equinenona y cantaxantina. El efecto de la variación de los parámetros como factores físicos (pH y temperatura) y factores nutricionales (fuente de carbono y nitrógeno) durante el cultivo pueden alterar las cantidades relativas de carotenoides producidos (Carmona et al., 2003).

Aki et al, (2003) describen que la cepa KH105, aislada como productora de DHA, también acumula niveles significativos de  $\beta$ -caroteno y xantofilas incluyendo cantaxantina y ASX. El efecto de la concentración de la fuente de nitrógeno se evaluó a cuatro días de cultivo de la cepa KH105 utilizando un medio compuesto de 10% de glucosa y una cantidad inferior a 0,3% como fuente de nitrógeno al 50% de agua de mar, la cantidad de ASX producida fue más de 6,1 mg/L y un contenido de cantaxantina que alcanza a más de 10 mg/L bajo condiciones donde se emplea una concentración alta de fuente de nitrógeno (6%). Esta cepa de acuerdo a morfología y características revela que pertenece al género *Schizochytrium*, y puede ser considerada como fuente promisoria de xantofilas y de DHA para uso en la industria de los alimentos. La misma cepa produce hasta 7,7 mg L<sup>-1</sup> ASX cuando crece en residuos destilería alcohólicas (Yamasaki et al. 2006).

### 1.8.2 Escualeno

El escualeno es un hidrocarburo alifático altamente insaturado y pertenece al grupo de los aceites triterpenos, es precursor de esteroles y carotenoides (Figura 1.3). Es utilizado en su forma natural como agente humectante o emoliente en la preparación de productos farmacéuticos y cosméticos. Pero lo más importante, es su potencial como inhibidor de oxidación, que puede proteger las células contra los radicales libres, reforzar el sistema inmunológico del cuerpo y disminuir el riesgo de varios tipos de cáncer (Rao, et al., 1998).

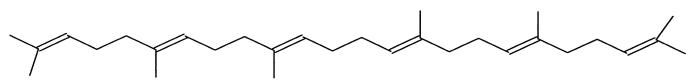


Figura 1.3. Estructura química del escualeno

Jiang et al., (2004) estudiaron el contenido de escualeno en la biomasa de 3 cepas de traustoquitridios pertenecientes a *Schizochytrium mangrovei*, FB1 FB2 y FB3, y dos cepas comerciales *Thraustochytrium sp.* ATCC26185 y *Schizochytrium sp.* ATCC20889 cultivadas a diferentes etapas de su fase estacionaria. La cepa FB1 presentó un contenido y rendimiento de escualeno de 0,162 mg/g célula de peso seco y 1,313 mg/L respectivamente. El contenido de escualeno en esta cepa fue superior a las obtenida desde *Saccharomyces cerevisiae* (0,041 mg/g peso seco) y *Thraustochytrium sp.* ACEM 6063 (0,1 mg/g peso seco), siendo todas cultivadas a la misma temperatura (Lewis et al., 2001). El rendimiento de escualeno desde células de traustoquitridios fue de 0,2 mg con un 95% de recuperación (Lu et al., 2003). Además, todas las cepas muestran una marcada disminución en contenido y rendimiento de escualeno al aumentar el tiempo de cultivo desde 3 a 5 días. Se desconoce el mecanismo que induce a este cambio aun cuando se propone que esta reducción en el contenido de escualeno bajo condiciones aeróbicas, podría deberse a que los mismos microorganismos lo consumen o debido a la conversión catalizada por oxígenos moleculares a otros compuestos tales como esteroles y carotenoides. Recientemente, Li et al., (2009) informan el contenido de escualeno de dieciocho cepas de traustoquitridios aislados de los manglares de Hong Kong. Todas las cepas crecen bien heterotróficamente con glucosa como única fuente de carbono. La biomasa varió desde 5,49 hasta 15,62 g/L y el contenido de escualeno 0,02 a 0,18 mg/g en 72 h. El mayor contenido de escualeno de 0,18 mg/g se detectó en la cepa BR-MP4-A1, que fue superior en un 11% a lo producido por *Schizochytrium mangrovei* FB1 (0,162 mg/g) en la misma condición de cultivo. La cepa que produce mayor contenido de

escualeno, BR-MP4-A1 fue identificada como una nueva variedad de especies de *Aurantiochytrium*. La mayor biomasa de *Aurantiochytrium* sp. BR-MP4-A1 se logró a las 72 h, mientras que su contenido máximo de escualeno alcanzado fue de 0,567 mg/g en 36 h pero después disminuyó rápidamente- (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2. Carotenoides y escualeno en traustoquitridios.**

Traustoquitridios	Carotenoides	Referencias
Cepa <i>Thraustochytrid</i> CHN-1	Principal astaxantina, equinenona, cantaxantina, foenicoxantina y $\beta$ - caroteno.	Carmona et al. (2003)
<i>Schizochytrium</i> KH105	$\beta$ -caroteno, cantaxantina y astaxantina (xantofilas)	Aki et al, (2003), Yamasaki et al. (2006)
<i>Schizochytrium mangrovi</i> FB1, FB2 <i>FB3, Thraustochytrium</i> sp. ATCC 26185, <i>Schizochytrium</i> sp.ATCC20889, <i>Thraustochytrium</i> sp. ACEM6063, <i>Aurantiochytrium</i> sp. BR-MP4-A1	escualeno	Jiang et al., (2004), Lu et al., (2003), Lewis et al., ( 2001), Li et al., (2009), Weet et al., (1997)

### 1.8.3 Esteroles

Los esteroles son lípidos de membrana producidos por todo los microeucariotes, y por un número limitado de bacterias (Volkman et al, 1998). Sus funciones incluyen controlar la fluidez y permeabilidad de la membrana, en algunas plantas tienen una función específica en la proliferación de la célula, traducción de señal, y como modulador de la

actividad enzimática en la membrana. Para los esteroles producidos por plantas superiores se han encontrado varias aplicaciones como: precursores para la producción de esteroides, nutracéuticos, y aditivos de alimento para beneficio de la salud humana y animal además como surfactante natural.

La etapa principal en la síntesis de esteroles, es la oxigenación del escualeno a la forma de (3S)- epoxi escualeno (3S- escualen-2,3-óxido), el cual es transformado por una de las dos enzimas para formar lanosterol o cicloartenol. Estos dos compuestos sufren una serie de nuevas reacciones para dar nuevos esteroles como producto tales como, brasicasterol, sitosterol, campesterol, y estigmasterol que comúnmente se encuentran en plantas denominados fitoesteroles

Al investigar la cepa *Thraustochytrium sp* ATCC 26185, para determinar su potencial en la producción de DHA y su composición de lípidos, se encontró que el escualeno representa el 63% de los lípidos no saponificables y la composición de colesterol del 41% del total de esteroles. (Weet et al., 1997).

Lewis et al. (2001) estudiaron la composición de esteroles de la cepa ACEM 6063 tentativamente identificada como traustoquitrídio, determinando el efecto de la temperatura de cultivo, concentración de oxígeno disuelto (OD) y edad del cultivo sobre el contenido de escualeno y esterol en la biomasa. Desde su biomasa se recuperaron veinte esteroles, trece de los cuales fueron identificados. Los dos esteroles principales en todas las muestras fueron colest-5-en 3 $\beta$ -ol y 24-etilcolesta-5,22 E-dien-3 $\beta$ -ol, estos dos esteroles representan el 35% a 80% del total de ellos. Los esteroles presentes en cultivos de crecimiento con alto contenido de oxígeno disuelto fueron colest-5-en 3 $\beta$ -ol, 24-etilcolesta-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol, 24-metilcolesta-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol y una mezcla formada por un esterol desconocido y el 24-

etilcolesta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol. Los cultivos producidos con bajo contenido de oxígeno disuelto a temperaturas de 15°C, 20°C y 25°C también contienen estos esteroles, pero niveles levemente más bajos. En estos se encontraron los siguientes esteroles a niveles mayores que 3% del total de esteroles: colest-8(9)-en-3 $\beta$ -ol, 5 $\alpha$ -colest-7-en-3 $\beta$ -ol, 24-metilcolesta-5,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol, 24-etilcolesta-5,24(28)E-dien-3 $\beta$ -ol, 24-ethylcolesta-5,24(28)Z-dien-3 $\beta$ -ol y cuatro esteroles no identificados. El mayor contenido de escualeno es obtenido en el cultivo que crece a 15°C con bajo OD y disminuye secuencialmente en cada tiempo de muestreo 4, 2 y 0 día previo al peak de biomasa ( $T_{-4}$  a  $T_{-2}$  a  $T_p$ ) desde 1,8; 1,5 y 1,2 mg/g de peso seco respectivamente.

**Tabla 1.3. Esteroles en traustoquitridios**

Traustoquitridios	Esteroles	Referencias
	C27(5), C29(5,22), C28(5,22), C29(5,7,22)	
<i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC 26185	Colesterol	Weet et al., (1997)
<i>Thraustochytrium</i> sp. <i>ACEM6063</i>	Colest-5-en-3 $\beta$ -ol; 24-etilcolesta-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol; colest-5-en- 3 $\beta$ -ol; 24-metilcolesta-5,22E-dien- 3 $\beta$ -ol; 24-eticolesta-5,7,22-trien- 3 $\beta$ -ol; colest-8-en- 3 $\beta$ -ol; 5 $\alpha$ -colest-7-en-3 $\beta$ -ol; 24-metilcolesta-5,24(28)-dien- 3 $\beta$ -ol; 24-etilcolesta-5,24(28)E-dien-3 $\beta$ -ol; 24- etilcolesta-5,24(28)Z-dien-3 $\beta$ -ol.	Lewis et al.,( 2001)

## **1.9 Conclusiones**

La razón principal del interés por los ácidos grasos especialmente los AGPIs, (ARA, EPA, DHA) es consecuencia de su importancia en la salud humana y animal. Por ejemplo, ellos son precursores de moléculas reguladoras tan relevantes como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, y son componentes de acil lípidos en las membranas de la retina y cerebro. Normalmente los humanos sintetizan estos ácidos desde ácido linoleico (18:2 n-6) y ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3), ácidos grasos esenciales que son derivados desde plantas. Alternativamente, el DHA y EPA pueden ser proporcionados como componentes de lípidos desde aceite de pescado, el que presenta problemas de sabor y olor y una mezcla de ácidos que incluye tanto n-6 como n-3. También es bien conocido el futuro desabastecimiento en todo el mundo de aceite marino debido a la demanda para la producción acuícola.

Se ha puesto de manifiesto la potencialidad de las microalgas para la producción de gran variedad de sustancias, algunas de ellas de elevado valor, como AGPIs, pigmentos, vitaminas, antibióticos, productos farmacéuticos y otros productos químicos de interés, así como hidrógeno, hidrocarburos y otros combustibles biológicos.

La búsqueda de microalgas con la capacidad de producir importantes cantidades de AGPIs partió, inicialmente, con la evaluación de perfiles de ácidos grasos de las especies ya conocidas; posteriormente se comenzó a estudiar las condiciones de cultivo que favorecían la formación de determinados ácidos grasos.

La temperatura, afecta tanto a la producción de biomasa como a la composición y proporción de los de ácidos grasos en los ácidos grasos totales. Normalmente a

temperaturas altas aumenta la producción de ácidos grasos saturados y por el contrario, bajas temperaturas favorecen la producción de AGPIs.

Actualmente de las microalgas, solamente la especie *Cryptochodinium cohnii*, está siendo utilizada en la producción de DHA a escala industrial en grandes fermentadores. En los últimos años se ha estado estudiando la conversión de microalgas fototróficas estrictas a heterotróficas mediante ingeniería metabólica, se ha logrado cultivar la especie *Phaeodactylum tricornutum* en ausencia de luz y presencia de glucosa.

De las diferentes especies de traustoquitrídos, aquellas del género *Schizochytrium* y *Thraustochytrium* son las que presentan los más altos porcentajes de DHA sobre la base de la biomasa seca, lo anterior debido a la alta concentración de lípidos totales en esta biomasa y que ha llegado alcanzar valores superiores a 75%.

Aun cuando, los estudios realizados en estos microorganismos, ha estado principalmente dirigido a la producción de DHA, estos son capaces también de producir otros AGPIs, tales como ARA, DPA, LA y EPA. Además, se ha estudiado en estas especies, la producción de otros compuestos lipídicos como escualeno, carotenoides, esteroles y glicoesfingolípidos.

La producción de SCO está limitada por los altos costos de producción, pero actualmente ha aumentado el interés basado en la capacidad que presentan algunos microorganismos de producir determinados ácidos grasos con un alto valor comercial, esto es debido a que no existen actualmente otras fuentes disponibles y abundantes que provean estos tipos de ácidos grasos. Las características de un buen productor de SCO industrial son: capaz de acumular un alto porcentaje de lípidos, crecer heterotróficamente, crecer a bajas salinidades, formar biomasa/producto a temperaturas altas, producir una alta

proporción de lípidos totales como el producto deseado, producir un bajo contenido de AG monoinsaturados y AGPIs no deseados en el producto. Las células del organismo tiene que ser no pigmentadas, los AGPIs deben estar presentes como triglicéridos si es para consumo humano, el aceite debe ser fácilmente extraído de la biomasa y para ser aplicado en la acuicultura el tamaño del organismo debe ser pequeño.

Otro constituyente lípidico importante desde microorganismos marinos son los terpenoides. El alga *Dunaliella salina* es la fuente natural de β-caroteno y es desarrollada comercialmente como fuente de β-caroteno, usada como suplemento en dietas y colorante natural de alimento. Los microorganismos más estudiadas para la producción de ASX han sido *Xanthophyllomyces dendrorhous* (previamente conocida como la levadura *Phaffia rhodozyma*) y *Haematococcus pluvialis* (microalga). Los traustoquitridios, también acumulan pigmentos carotenoides tales como, β-caroteno astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinanona y fenicoxantina (Carmona et al. 2003, Aki et al. 2003; Armenta et al, 2006, Burja and Radianingtyas 2005, Burja et al. 2006).

Los esteroles son componentes esenciales de la membrana de todos los organismos eucariontes. Son precursores para la producción de esteroides, nutraceuticos y aditivos para alimentos. Una variedad de microorganismos incluyendo microalgas han sido usados para degradar esteroles y producir esteroides. La capacidad de cultivar biomasa desde microorganismos proporciona una variedad de estructuras de esteroles por manipulación química y enzimática.

## **1.10 Investigación propuesta**

En Chile y en especial la Región de Los Lagos, en los últimos años ha experimentado una creciente y sostenida actividad económica-industrial en las áreas de la acuicultura, silvoagropecuaria y forestal. El desarrollo de la agroindustria trae consigo un incremento en la generación de subproductos y residuos donde características nutricionales de algunos de ellos les permite ser utilizados en la elaboración de alimentos para animales. Otra utilidad podría ser como sustratos para la elaboración de productos de más alto valor utilizando microorganismos. En la industria de alimentos existe una variedad de estos residuos que contienen cantidades importantes de carbono y nitrógeno que no son utilizados y además su disposición constituye un problema medio-ambiental.

Los traustoquitridios son microorganismos protistas heterotróficos marinos, eucarióticos y unicelulares, que producen enzimas extracelulares, tales como, celulasas amilasas, xilanases, proteasas, lipasas y pectinasas que les permiten hidrolizar y remineralizar material orgánico. Estos microorganismos son estudiados fundamentalmente por su morfología y ecología, y actualmente alcanzan una mayor relevancia por la capacidad que presentan de producir lípidos especialmente AGPIs del tipo n-3, específicamente el ácido docosahexaenoico (DHA).

De acuerdo a la evidencia experimental disponible, es claro que los traustoquitridios pueden ser cultivados en sistemas cerrados y que éstos utilizan diferentes fuentes de carbono para producir biomasa, lípidos y ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Además, presentan la capacidad de asimilar compuestos orgánicos provenientes de residuos industriales para producir biomasa y productos.

El conocimiento de la ecología, habitats y comportamiento en la trama trófica de los traustoquitridios, sugiere que ciertos residuos de origen agroindustriales constituidos por moléculas complejas podrían ser utilizados como fuentes alternativas de carbono para la producción de AGPIs de interés tanto en alimentación animal como humana.

De acuerdo a las características de estos microorganismos el objetivo de este estudio fue evaluar del efecto de la composición del residuo en el crecimiento celular y producción de DHA en residuos líquidos provenientes de la industria alimentaria productora de papas fritas y un subproducto de la fabricación de la cerveza (bagazo).

### **1.11 Hipótesis**

Los microorganismos marinos heterotróficos de la familia *Thraustochytriaceae* son capaces de utilizar varias formas de carbono orgánico en distintos niveles de concentración, entonces es posible emplear residuos líquidos provenientes de la industria alimentaria como fuente de carbono para su crecimiento celular y producción de DHA.

### **1.12 Objetivo General**

Establecer la capacidad de crecimiento y producción de DHA por cepas nativas de la familia *Thraustochytriaceae* en residuos líquidos de la industria alimentaria.

### **1.13 Objetivos específicos**

1. Determinar la cepa y residuo industrial más apropiado para la producción de biomasa y DHA a partir de los residuos industriales líquidos.

2. Evaluar el efecto del pH, tiempo de cultivo y concentración del residuo en el crecimiento y producción de DHA para la(s) cepa(s) seleccionada(s).
  
3. Evaluar el efecto de diferentes nutrientes (EL, GMS, Vitaminas) en el crecimiento y producción de DHA en la cepa seleccionada.

## CAPITULO II

### POTENCIAL PRODUCCIÓN HETEROTRÓFICA DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (C22:6 n-3, DHA) POR CEPAS NATIVAS DE TRAUSTOQUITRIDIOS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS.

#### 2.1 Resumen

Las cepas nativas *Thraustochytriidae* sp. M12-X1, *Thraustochytriidae* sp. C41 y *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 aisladas desde la zona costera en Chinquihue, Puerto Montt, Chile que presentan similitud a *Thraustochytrium kinnei* (99% identidad), *Schizochytrium minutum* (97% identidad), y 99% a *Ulkenia sp.*, respectivamente fueron cultivadas usando subproducto de la fabricación de la cerveza (RC) y los residuos del procesamiento de las papas fritas (RP1 y RP2) como fuentes de C. Las cepas tienen la característica de acumular ácido grasos de interés comercial tales como docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA), además la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 acumula astaxantina (3,3'-dihidroxi-β, β'-caroteno-4, 4'-diona, ASX). Los resultados obtenidos en las fermentaciones con residuos fueron comparados con los obtenidos por las mismas cepas en fermentaciones de glucosa, maltosa, almidón soluble y etanol. La producción de DHA durante la fermentación de RC fue superior a las obtenidas en las fermentaciones de fuentes puras para las cepas *Thraustochytriidae* sp. C41 y M12-X1. Para la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 la producción de DHA durante la fermentación de RC fue similar a la obtenida al usar almidón como fuente de C y superior a la obtenida en la fermentación de glucosa y maltosa. En las fermentaciones con el residuo RC suplementado con fuentes de nitrógeno (extracto

de levadura (EL) y glutamato monosódico (GMS) las cepas produjeron la mayor concentración de biomasa (2,3 g/L C41 y M12-X1, 5,9 g/L AS4-A1). Con respecto al contenido de DHA en los ácidos grasos producidos por las cepas de traustoquitridos nativos, este fue dependiente de la fuente de carbono utilizada; el mayor contenido de DHA en la biomasa de la cepa *Thraustochytriidae* sp. C41 (40,3 mg/g), *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 (120,2 mg/g) y *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 ( $137 \pm 19$  mg/g) fue obtenido en la fermentación de Et-GMS-EL, GMS-EL y RP1/EL, respectivamente. Aun cuando las cepas son capaces de producir DHA en la fermentación del RC como una fuente de C y N, el uso de extracto de levadura (EL) y glutamato monosódico (GMS) permitió incrementar la productividad en DHA. La mayor productividad de DHA se obtuvo con fermentaciones de RC-EL-GMS por las cepas *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 (55,1 mg/L/día) y la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 (88,0 mg/L/día) en relación al obtenido en la fermentación del mismo medio por la cepa *Thraustochytriidae* sp. C41 (11,4 mg/L/día). Para la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 al usar las fuentes de N y vitamina (tiamina, biotina y cobalamina), permitió un aumento significativo de la productividad de DHA (540 mg/L/día), y la concentración de biomasa ( $14.9 \pm 0.4$  g/L) y DHA ( $2698 \pm 132$  mg/L). En todos los casos la producción de DHA ocurre en el periodo de crecimiento. La ASX fue detectada en la biomasa en la fase de crecimiento tardía; la mayor productividad de ASX se obtuvo ( $63 \pm 3$  mg/L/día) en las fermentaciones de RC como única fuente de nutrientes.

## 2.2 Introducción

Se han descrito muchos efectos fisiológicos positivos de los AGPIs en humanos y animales (Uauy et al. 2001), particularmente del DHA, AGPI omega-3. El contenido de este ácido el cerebro es superior al 97% de los AGPI n-3 y, en la retina sobre el 95% (Kuratko and Salem, 2009). Las deficiencias de DHA están asociadas con varias enfermedades (síndrome fetal del alcohol, síndrome de déficit atencional, fibrosis cística, fenilcetonuria, depresión unipolar, hostilidad agresiva y adrenoleucodistrofia), hipertensión, artritis, arteriosclerosis, depresión, desarrollo de diabetes mellitus en adultos, infarto de miocardio, trombosis, asma, y cánceres dependientes/relacionado a funciones hormonales (Horrocks & Yeo, 1999; Stevens et al. 2003). Actualmente, la principal fuente de DHA son los peces y sus aceites. Los peces marinos tienen limitada capacidad para producir DHA y lo obtienen a través de la dieta (Sargent et al. 1989).

En el ecosistema marino la producción de DHA es atribuible principalmente al fitoplancton. Dentro del medio ambiente marino el fitoplancton, es tambien la fuente primaria de ASX, carotenoide que presenta una gran variedad de actividades fisiológicas asociadas a su alta actividad antioxidante (Guerin et al. 2003).

Diversos estudios relacionados con la producción microbiana de DHA y ASX han sido publicados. *Xanthophyllomyces dendrorhous* (previamente conocida como la levadura *Phaffia rhodozyma*) y *Haematococcus pluvialis* (microalga) han sido los microorganismos más estudiados para la producción de ASX, Con respecto al DHA los traustoquitridios (Labyrinthulomycetes), protistas que se encuentran en diversos hábitat marinos, acumulan en sus lípidos AGPIs de cadena larga (DHA, ARA, EPA) y pigmentos carotenoides (astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, β-caroteno, equinanona y fenicoxantina) (Carmona

et al. 2003, Aki et al. 2003; Armenta et al, 2006, Burja and Radianingtyas 2005, Burja et al. 2006). Los traustoquitridios incluyen especies que pertenecen a los géneros *Althornia*, *Japonochytrium*, *Aplanochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium* (conocido antes como *Schizochytrium*) y *Ulkenia* (Raghukumar 2002; Yokohama and Honda, 2007). Los traustoquitridios sintetizan enzimas extracelulares (ej. proteasas, celulasas, amilasas, lipasas, gelatinasas, ureasas, fosfatasas, quitinasas,  $\alpha$ -glucosidasa) (Bremer 2000; Raghukumar 2002; Taoka et al., 2009), que les permite utilizar diversos sustratos. Algunas cepas de la familia *Thraustochytriaceae* acumulan más del 50% de su peso seco como lípidos en los cuales el DHA representa más del 25% (Bajpai et al. 1991a; Bajpai et al. 1991b; Yaguchi et al. 1997; Yokochi et al. 1998). En los traustoquitridios, una pequeña fracción de lípidos (menos que 5%) es encontrada como fosfolípidos; en cambio la mayor proporción es acumulada como triacilgliceroles (70-98%) constituyendo las reservas de energía (Yaguchi et al. 1997). Además, el contenido de aceite de muchos tipos de microalgas y protistas marinos, excede la productividad de aceite de los mejores productores vegetales, por lo tanto, estas fuentes son potencialmente más atractivas para la producción de biodiesel que las plantas terrestres tradicionales (Chisti 2007; Miao and Wu 2006; Meng et al. 2009).

La producción de estas moléculas (DHA, ASX) a través de procesos biotecnológicos podría ser de interés comercial debido al alto valor de estos productos; € 2,000-3,000 por kg DHA (Sijtsma and De Swaaf, 2004) y U\$2,500-3,000 por kg ASX (Olaizola 2000).

Varios trabajos han evaluado el uso de los residuos y de los subproductos de la industria de alimento para diseñar medios de cultivos rentables (Fan et al. 2001; Unagul et

al. 2007; Yamasaki et al. 2006). Los residuos provenientes del procesamiento de la papa y uno de los subproductos de la fabricación de la cerveza (bagazo) podrían ser utilizados como nutrientes en la producción de biomasa microbiana y síntesis de productos. En Chile, el consumo de cerveza se ha incrementado desde 27,5 L per cápita en el año 2004 a 34,4 L en el año 2007, con una producción de 5.673.000 hL en el 2007; en promedio, 27 kg de residuos sólidos (bagazo) son generados por un hL de cerveza. Chile es el sexto productor de papas en Latino América (1,5 millones de toneladas en el año 2006) y el 10% de esa producción es procesada. En Chile, el bagazo obtenido del proceso de elaboración de cerveza artesanal se destina principalmente a alimentación animal sin mayor procesamiento, a pesar de su rica composición de nutrientes. Por otro lado, no se han identificado usos para los residuos líquidos y sólidos del procesamiento de la papa.

El objetivo de este trabajo fue examinar el potencial de los residuos líquidos provenientes del procesamiento de la papa y el subproducto de la fabricación de la cerveza como fuente de carbono para la producción de DHA por tres cepas nativas.

## **2.3 Material y Métodos**

**2.3.1 Reactivos.** Glutamato Monosódico (GMS), glucosa, etanol, metanol, NaOH, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, dicromato fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Germany). Peptona, extracto de levadura (EL) fue obtenido de Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England). El agar se obtuvo de Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA. Estreptomicina sulfato y penicilina G fue obtenida de Sigma–Aldrich Co. (Steinheim, Germany). FAME standards (Mix L209, FAME C20:0, C20:1, C20:4, C22:1, C22:6) fue obtenido de Alltech (USA). La composición del agua artificial (AMA) fue 1 L: NaCl 27.50 g, MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O 5.38 g, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 6.78 g, KCl 0.72 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.20 g, CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O 1.40 g.

**2.3.2 Residuos.** Dos de los residuos evaluados fueron obtenidos desde el procesamiento de papas para obtener papas fritas; RP1 corresponde al agua de lavado y RP2 es agua del agua fría de lavado inicial. El subproducto de la elaboración de la cerveza (RC) fue obtenido desde la filtración del bagazo. Los residuos fueron filtrados con gasa y posteriormente utilizando papel filtro (Advantec, Nº 1, 1 µm).

**2.3.3 Aislamiento de los microorganismos.** Tres cepas nativas, Thraustochytriidae sp., M12-X1, C41 y AS4-A1, fueron aisladas de muestras de agua y sedimentos recolectadas en la zona costera de Puerto Montt, al sur de Chile (41°28'18"S y 72°56'24" W). Durante el período de muestreo la salinidad y la temperatura media del agua fue de 30 psu y de 12,9 ± 2,7°C, respectivamente. El aislamiento se realizó por la técnica de polen de pino (Gaertner 1968). En resumen, a las muestras (10 mL) fueron agregados granos de polén (10 mg) y se

realizó una incubación por un periodo entre 7-10 días a 25°C. Los microorganismos adheridos a los granos de polen de pino fueron recolectados por filtración (filtro de nylon, 20 µm mesh) y cultivados sobre agar B [extracto de levadura 2 g/L, peptona 2 g/L, agar 10 g/L preparado en AMA al 70% p/v] que contenía antibioticos (sulfato de estreptomicina y penicilina G, 300 mg/L de cada uno) para evitar la proliferación de bacterias. Las placas fueron incubadas a 25°C hasta las colonias fueron visibles. Las colonias seleccionadas fueron subcultivadas en medio sólido B hasta obtener aislamientos puros (inspección microscopicas).

Todas las cepas fueron mantenidas a 4°C en medio sólido B1 (para 1L de AMS: peptona 1 g, EL 1 g, agar 10 g; pH 6.5) conteniendo sulfato de estreptomicina y penicilina G (300 mg/L); las células fueron cultivadas y sembradas mensualmente.

*2.3.4 Análisis filogenético y extracción del DNA de la cepa Thraustochytriidae sp. AS4-A1.*

Las colonias aisladas obtenidas de las placas de agar fueron suspendidas con agua destilada (200 µL) y centrifugadas (8000g, 5 min a 4 °C). Los restos celulares fueron re-suspendidos con un buffer de lisis (200 µL, 0.25 M Tris-Cl, 0.1 M Na<sub>2</sub>-EDTA, 2% p/v y 0.1 M NaCl, pH 8.2). El DNA fue extraído por el protocolo de extracción por alcohol fenol/cloroformo/isoamyl y el protocolo de precipitación por etanol (Sambrook et al. 1989). El DNA purificado fue disuelto en doble agua destilada. Cinco µL de la solución de DNA fue mezclado con 2.5 µL of 5 mM de solución de deoxynucleotidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP; Mezcla de bioherramientas de deoxynucleotidos B&M Labs SA, España), 5 U de DNA polymerasa (Biotools B&M Labs SA, Spain) y 1.25 µM de cada primer [JVF (5'-TTGATCCTGCCAGTAGTCATA T-3') y JVR (5'-

CAAACCTTGTACGACTTCA-3’)]. Para obtener la secuencia completa, primers internos fueron usados para secuenciar regiones parciales con bases superpuestas. Los productos del PCR del gel de agarosa fueron purificados usando el kit de extracción V-Gene (Biochtechnology Ltd, Zhejiang, China) y los fragmentos de DNA fueron secuenciados (ABI-3100, Applied Biosystem, California, USA). El numero de acceso FJ010826 fueron comparadas con aquellas disponibles en la base de datos de GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA: NCBI Home page <http://www.ncbi>). La búsqueda por las secuencias homólogas más cercanamente relacionadas fue hecha usando el programa BLAST (Altschul et al. 1990) disponible en el sevidor web de NCBI.

*2.3.5 Condiciones de cultivo.* El inóculo fue preparado transfiriendo células desde las placas con agar B1 a 50 ml de medio B2 estéril (para 1 L AMS: glucosa, 20 g, EL, 2 g, GMS, 2 g). La incubación se realiza por 48 h a 25°C en matraces agitados (180 rpm). El medio con residuo contenía EL (2 g/L) o EL-GMS (2 g/L de ambos) y las sales el AMA. Antes de esterilización (121°C, 15 min) el pH del medio fue fijado (NaOH or HCl) a 6.5, a menos que se especifique otro valor. El medio de crecimiento estéril (100 mL) fue inoculado (5% v/v, la absorbancia del inóculo 0,6 a 600 nm) e incubado a 25°C en matraces agitados, por 72 h. Fermentaciones de glucosa (20 g/L), maltosa (20 g/L), almidón (20 g/L) y etanol (2 g/L) todas conteniendo EL-GMS y fermentaciones de EL-GMS (medio control) fueron realizadas. Los resultados están presentados como el promedio ± desviación estándar de ensayos en triplicado.

Los datos para la curva de crecimiento de la cepa de Thraustochytriidae sp., M12-X1 y Thraustochytriidae sp., AS4-A1 fueron obtenidos desde matraces agitados de 250 mL conteniendo 100 mL de medio con RC-EL-GMS y RC-EL-GMS-vitmina-B (1 mL de una solución concentrada (tiamina 1 mg/L, biotina 0.0005 mg/L and cobalamina 0.0005 mg/L, esterilizada por filtración, 0.2  $\mu$ m) incubado a 25°C. Dos matraces fueron retirados cada 24 h para análisis. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar de ensayos en duplicado.

### *2.3.6 Métodos analíticos.*

*2.3.6.1 Producción de biomasa y contenido de carbohidratos totales residuales.* La biomasa total fue recuperada por centrifugación (4000g, 10 min, 4 °C) lavada tres veces con agua estéril destilada, congelada, liofilizada, y su peso fue determinado gravimétricamente. El contenido de carbohidratos totales residuales fue determinado utilizando el método de antrona (Morris, 1948).

*2.3.6.2 Análisis proximal.* La composición proximal de sólidos en los residuos líquidos fue determinada de acuerdo al método AOAC (AOAC 1995). El agua fue evaporada a 65°C. El contenido de proteínas fue determinado por la medida de nitrógeno ( $N \times 6,25$ ) por el método Kjeldhal; el contenido de cenizas fue determinado por combustión a 550°C por 6 h. El ensayo para grasa fue realizado utilizando el método Soxhlet. El extracto no nitrogenado (ENN) fue determinado de la diferencia entre el peso seco de la muestra y el contenido de ceniza, proteína y grasa.

*2.3.6.3 Demanda química de oxígeno (DQO).* El DQO fue determinado de acuerdo a la Norma Chilena (NCh2313/24.Of97). Brevemente, la material orgánica fue oxidada por

dicromato en medio de ácido sulfúrico a 150°C por 2 h en tubos DQO. Posteriormente después de llevar los tubos COD a temperatura ambiente, los niveles de DQO fueron determinados midiendo la absorbancia a 600 nm de la solución de ensayo.

**2.3.6.4 Elementos traza.** Las muestras de residuo líquido fueron analizadas para disoluciones de Mn, Mg, Fe y Cu en un espectrómetro de absorción atómica (EAA a la llama; Perkin Elmer, model AANALISYST 200), con doble haz y correcciones de fondo automático, y uso de lámparas de cátodo hueco. (Mito Riko, Japan) para los elementos metálicos respectivos. Una mezcla aire –acetileno fue utilizada como combustible. Las determinaciones de EAA a la llama fueron realizadas de acuerdo a las condiciones de operación instrumental recomendadas por el fabricante.

**2.3.6.5 Análisis elemental.** Muestras (0,5 a 2,0 mg) de biomasa liofilizada fueron analizadas en un Analizador elemental (Euro Vector Instrument model Euro EA and software).

**2.3.6.6 Análisis de ácidos grasos.** Muestras de biomasa liofilizada (20 a 50 mg) fueron utilizadas para una transesterificación directa (Lewis et al. 2000). Los metil ésteres de ácidos grasos (MEAGs) en la capa de hexana fueron colectados por centrifugación a 4°C. Los MEAGs fueron analizados por 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°C a 300°C con una tasa de incremento de 5°C/min. Un detector de ionización de llama con helio como gas transportador (200°C) fue utilizado. El inyector fue mantenido a 250°C. El volumen de inyección fue 1 µL. Los picos de los MEAGs fueron identificados y cuantificados utilizando patrones de ácidos grasos.

*2.3.6.7 Estadística y cálculos.* El test ANOVA seguido por prueba de comparación múltiple de Tukey o Ducan fue utilizado para analizar los datos. La significancia de los efectos fue determinada a un nivel de confianza de 0,05 (5%). Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar para los ensayos replicados. Los coeficientes de rendimiento para la biomasa y producto sobre el sustrato fueron calculados desde razón en masa entre el producto sintetizado y el sustrato consumido. Los coeficientes de rendimiento de CHT en los productos (biomasa, DHA y ASX) fueron calculados desde razón entre la masa de producto sintetizado y los carbohidratos totales consumido.

La relación molar C: N fue determinada de la siguiente forma:  $N=[(\text{concentración del EL})*0,109+(\text{concentración del GMS})*0,153+(\text{concentración del N en el residuo})]/14$ ,  $C=[(\text{concentración del EL})*0,175+(\text{concentración del GMS})*0,328+(\text{concentración de C en el residuo})]/16$ . También fue asumido que los porcentajes de C y de N en EL eran 17.5% y 10.9% (técnico 28860), respectivamente; en GMS estos porcentajes eran 35.5% y 8.3%, respectivamente.

## **2.4 Resultados**

### *2.4.1 Caracterización proximal, elemental y químico de los residuos líquidos*

La composición de sólidos soluble en los residuos líquidos RP1 (agua de lavado) y RP2 (agua fría de lavado inicial) del procesamiento de papa, y RC (bagazo filtrado) subproducto proveniente de la producción de cerveza se presenta en la Tabla 2.1. Las concentraciones de proteína cruda y extracto libre de nitrógeno de los residuos líquidos RP1, RP2 y RC fueron 42,8 y 30,9%; 29,4 y 52,9%; 7,8 y 85,1% respectivamente. La razón C/N en RP1, RP2 y RC fueron 172, 181, y 42, respectivamente. Entre los tres residuos, RC contiene más Mn (0,184 mg/L) y fosfato mientras que RP2 presentó un mayor contenido de Mg (264 mg/L). El DQO de RP1, RP2 y RC fueron 6.020; 9.820 and 34.900 mg/L, respectivamente. RC contiene un 3,22% de sólidos en los cuales el N corresponde al 1,2% y el C al 50,44%.

### *2.4.2 Efecto de la composición del medio de cultivo en la producción de biomasa y DHA por tres cepas nativas *Thraustochytriidae sp. C4I, M12-XI y AS4-A1.**

Las cepas de traustoquitridios fueron cultivadas en seis medios de cultivo en los cuales los residuos fueron utilizados como fuente de carbono. Se evaluó la suplementación de dos fuentes diferentes de nitrógeno extracto de levadura (EL) y extracto de levadura más glutamato monosódico (EL-GMS). Fermentaciones de fuentes de carbono puro [glucosa (G), maltosa (M), almidón soluble (Alm) y etanol (Et)] y una mezcla de fuente de nitrógeno (EL-GMS) fueron realizadas como experimentos de control.

**Tabla 2.1.** Análisis proximal, elemental y químico de los residuos líquidos utilizados para el crecimiento de cepas nativas de traustoquitridos. Residuos líquidos del procesamiento de la papa, RP1, RP2; residuo líquido del subproducto de la elaboración de la cerveza RC.

	RP1	RP2	RC
Sólidos (%*)	0,42	0,17	3,22
Ceniza (%**)	23,8	17,6	5,9
Proteínas (%**)	42,8	29,4	7,8
Grasas (%**)	4,8	5,9	1,2
CHT (g/L)	17,3	16,9	29,4
E.N.N (%**)	30,9	52,9	85,1
N (%**)	0,36	0,23	1,2
C (%**)	61,95	41,61	50,44
H (%**)	32,06	6,47	24,74
Fosfato (mg/L)	163,0	117,8	319,2
Mg (mg/L)	73	264	0,095
Mn (mg/L)	< 0,08	0,094	0,184
Fe (mg/L)	< 0,440	1,055	< 0,440
Cu (mg/L)	0,131	0,364	0,361

\* : en el líquido; \*\* : en sólidos solubles

Las Tablas 2.2, 2.3 y 2.4 muestran la concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa y productividad de DHA obtenida en fermentaciones de 3 días de las diferentes fuentes de carbono por las cepas *Thraustochytriidae* sp. C41, *Thraustochytriidae* sp. M12-X1, y *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 respectivamente.

**Tabla 2.2.** Efecto de la fuente de carbono sobre la concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa y productividad de DHA ( $P_{DHA}$ ) de las fermentaciones de *Thraustochytriidae* sp. C41 (3 d, cultivo en matraces erlenmeyer). Residuos líquidos del procesamiento de la papa, RP1, RP2; residuo líquido del subproducto de la elaboración de la cerveza RC; glucosa G; maltosa, M; Almidón, Alm; etanol, Et; extracto de levadura, EL; glutamato monosodico, GMS.

Medio	Biomasa (g/L)	DHA (mg/g)	AGT (%*)	DHA (mg/L)	$P_{DHA}$ (mg/L/día)
RP1/EL	0,4 ± 0,02 <sup>c,d</sup>	14,9 ± 2,5 <sup>b,c</sup>	13,3 ± 0,32	6,0 ± 0,9 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,3 <sup>b</sup>
RP2/EL	0,3 ± 0,03 <sup>d</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC/EL	0,7 ± 0,02 <sup>c</sup>	2,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	2,9 ± 0,07	1,5 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>b</sup>
RP1/EL-GMS	1,2 ± 0,20 <sup>b</sup>	36,7 ± 5,8 <sup>a</sup>	13,6 ± 1,1	44,1 ± 14,4 <sup>a</sup>	14,7 ± 4,8 <sup>a</sup>
RP2/EL-GMS	1,3 ± 0,10 <sup>b</sup>	35,0 ± 11,4 <sup>a</sup>	16,1 ± 1,5	46,8 ± 15,9 <sup>a</sup>	15,6 ± 5,3 <sup>a</sup>
RC/EL-GMS	2,3 ± 0,40 <sup>a</sup>	15,3 ± 2,3 <sup>b,c</sup>	8,1 ± 1,0	34,2 ± 4,8 <sup>a</sup>	11,4 ± 1,6 <sup>a</sup>
G/EL-GMS	0,3 ± 0,02 <sup>d</sup>	10,1 ± 3,3 <sup>b,c</sup>	4,9 ± 0,1	3,3 ± 0,9 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>b</sup>
M/EL-GMS	0,7 ± 0,06 <sup>c</sup>	8,3 ± 1,9 <sup>b,c</sup>	3,3 ± 0,13	6,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,2 <sup>b</sup>
Alm/EL-GMS	2,3 ± 0,36 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,3 <sup>b,c</sup>	2,6 ± 0,02	11,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
Et/EL-GMS	0,3 ± 0,01 <sup>d</sup>	40,3 ± 4,0 <sup>a</sup>	n.d.	11,4 ± 0,9 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,3 <sup>b</sup>
EL-GMS	0,5 ± 0,10 <sup>c,d</sup>	17,6 ± 2,6 <sup>b</sup>	8,8 ± 0,6	8,4 ± 1,2 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,4 <sup>b</sup>

n.d. no determinado

Dentro de una columna, las medidas sin una letra superíndice común difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

\*porcentaje en la biomasa.

La mayor concentración de biomasa (2,3 g/L) de la cepa *Thraustochytriidae* sp. C41 fue obtenida en fermentaciones de RC-EL-GMS y Alm-EL-GMS (Tabla 2.2). La

concentración de biomasa fue 360% más alta que la obtenida en la fermentación del medio control que contenía la mezcla de fuente de nitrógeno (EL-GMS). La misma concentración de biomasa fue obtenida en la fermentación de RC-EL-GMS por la cepa *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 (Tabla 2.3).

La concentración más alta de biomasa de la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 ( $5,2 \pm 0,3$  g/L) fue obtenida en la fermentación de RC-EL-GMS; este valor no fue significativamente diferente ( $p > 0,05$ ) al obtenido en la fermentación de almidón ( $4,9 \pm 0,1$  g/L) (Tabla 2.4). La suplementación de GMS en el medio RC-EL permitió un aumento en la concentración de biomasa, (más de un 36%) sin efecto significativo ( $p > 0,05$ ) sobre el contenido de DHA en la biomasa. La glucosa y el etanol fueron pobremente fermentados por la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1; la producción de biomasa en las fermentaciones de estas fuentes de carbono fue similar a la obtenida en la fermentación de las fuentes de nitrógeno sin una fuente de carbono ( $0,3 \pm 0,0$  g/L).

El contenido de DHA en la biomasa de las diferentes cepas de traustoquitrídios fue significativamente ( $p < 0,05$ ) afectada por la composición del medio. El mayor contenido de DHA en la biomasa de C41 (40,3 mg/g) y M12-X1 (120,2 mg/g) fue obtenido en la fermentación de Et-GMS-EL, GMS-EL, respectivamente (Tabla 2.2 y 2.3). En las fermentaciones de residuos suplementados con la mezcla de las fuentes de nitrógeno por las cepas *Thraustochytriidae* sp. C41 y *Thraustochytriidae* sp. M12-X1, se obtuvo un mayor contenido de DHA comparado con los valores obtenidos en las fermentaciones en las cuales se utilizó EL como única fuente de nitrógeno.

**Tabla 2.3.** Efecto de la fuente de carbono sobre la concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa y productividad de DHA ( $P_{DHA}$ ) de las fermentaciones de *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 (3 d, cultivo en matraces erlenmeyer). Residuos líquidos del procesamiento de la papa, RP1, RP2; residuo líquido del subproducto de la elaboración de la cerveza RC; glucosa G; maltosa, M; Almidón, Alm; etanol, Et; extracto de levadura, EL; glutamato monosodico, GMS.

Medio	Biomasa (g/L)	DHA (mg/g)	AGT (%*)	DHA (mg/L)	$P_{DHA}$ (mg/L/día)
RP1/EL	0,6 ± 0,02 <sup>d</sup>	25,3 ± 0,3 <sup>d,e</sup>	5,6 ± 0,2	16,2 ± 0,0 <sup>e</sup>	5,4 ± 0,0 <sup>e</sup>
RP2/EL	0,6 ± 0,02 <sup>d</sup>	29,8 ± 2,7 <sup>d</sup>	5,2 ± 0,9	18,6 ± 1,8 <sup>e</sup>	6,2 ± 0,6 <sup>e</sup>
RC/EL	1,7 ± 0,10 <sup>b</sup>	16,0 ± 3,2 <sup>d,e</sup>	6,8 ± 0,3	27,9 ± 6,6 <sup>d,e</sup>	9,3 ± 2,2 <sup>d,e</sup>
RP1/EL-GMS	1,0 ± 0,05 <sup>c</sup>	73,0 ± 11,0 <sup>b,c</sup>	15,8 ± 0,15	83,7 ± 11,1 <sup>b,c</sup>	25,2 ± 3,7 <sup>b,c</sup>
RP2/EL-GMS	1,0 ± 0,20 <sup>c</sup>	58,0 ± 0,5 <sup>c</sup>	9,7 ± 0,68	55,5 ± 8,4 <sup>c,d</sup>	18,5 ± 2,8 <sup>c,d</sup>
RC/EL-GMS	2,3 ± 0,30 <sup>a</sup>	72,5 ± 2,9 <sup>b,c</sup>	16,1 ± 0,12	165,3 ± 20,1	55,1 ± 6,7 <sup>a</sup>
G/EL-GMS	1,1 ± 0,06 <sup>c</sup>	102,8 ± 9,7 <sup>a,b</sup>	23,9 ± 0,1	116,1 ± 14,4 <sup>a</sup>	38,7 ± 4,8 <sup>a</sup>
M/EL-GMS	1,0 ± 0,07 <sup>c</sup>	97,6 ± 9,7 <sup>b</sup>	20,7 ± 0,6	98,1 ± 14,4 <sup>a,b</sup>	32,7 ± 4,8 <sup>a,b</sup>
Alm/EL-GMS	1,1 ± 0,08 <sup>c</sup>	9,8 ± 1,5 <sup>e</sup>	2,5 ± 0,06	11,1 ± 1,2 <sup>e</sup>	3,7 ± 0,4 <sup>e</sup>
Et/EL-GMS	0,8 ± 0,10 <sup>c,d</sup>	100,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	n.d.	80,4 ± 7,2 <sup>b,c</sup>	26,8 ± 2,4 <sup>b,c</sup>
EL-GMS	0,5 ± 0,02 <sup>d</sup>	120,2 ± 18,1 <sup>a</sup>	13,2 ± 0,15	40,8 ± 7,8 <sup>c,d</sup>	20,4 ± 2,6 <sup>c,d</sup>

Dentro de una columna, las medidas sin una letra superíndice común difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

\*porcentaje en la biomasa.

El contenido más alto de DHA en la biomasa de AS4-A1 ( $137\pm19$  mg/g) fue obtenido en la fermentación de RP1-EL mientras que el contenido promedio de DHA en la biomasa crecida en RC-EL-GMS, RP2-EL-GMS, almidón-EL-GMS, y maltosa-EL-GMS fue  $55\pm5$  mg/g.

La productividad de DHA en las fermentaciones de las cepas nativas fue significativamente ( $p<0,05$ ) afectada por la composición del medio de cultivo. La fermentación de RC-EL-GMS por la cepa *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 exhibió una mayor productividad de DHA (55,1 mg/L/día) en relación al obtenido en la fermentación del mismo medio por la cepa *Thraustochytriidae* sp. C41 (11,4 mg/L/día). Mientras que las fermentaciones de RC-EL-GMS y almidón-EL-GMS por la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 presentaron la más alta productividad de DHA,  $88\pm11$  (mg/L/día).

**Tabla 2.4.** Efecto de la fuente de carbono sobre la concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa y productividad de DHA ( $P_{DHA}$ ) de las fermentaciones de *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 (3 d, cultivo en matraces erlemeyer). Residuos líquidos del procesamiento de la papa, RP1, RP2; residuo liquido del subproducto de la elaboración de la cerveza RC; glucosa G; maltosa, M; Almidón, Alm; etanol, Et; extracto de levadura, EL; glutamato monosodico, GMS.

	Biomasa (g/L)	DHA (mg/g)	AGT (%*)	DHA (mg/L)	$P_{DHA}$ (mg/L/día)
RP1/EL	0,9 ± 0,1 <sup>c</sup>	137 ± 19 <sup>a</sup>	31 ± 2 <sup>c</sup>	122 ± 7 <sup>c</sup>	41 ± 3 <sup>c</sup>
RP2/EL	1,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	1 ± 0 <sup>f</sup>	1 ± 0 <sup>f</sup>	1 ± 0 <sup>e</sup>	0 ± 0 <sup>e</sup>
RC/EL	3,8 ± 0,6 <sup>b</sup>	46 ± 6 <sup>bc</sup>	38 ± 3 <sup>b</sup>	171 ± 3 <sup>b</sup>	57 ± 1 <sup>b</sup>
RP1/EL-GMS	1,3 ± 0,0 <sup>c</sup>	47 ± 2 <sup>bc</sup>	22 ± 2 <sup>d</sup>	59 ± 2 <sup>d</sup>	20 ± 1 <sup>d</sup>
RP2/EL-GMS	1,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	54 ± 1 <sup>bc</sup>	22 ± 1 <sup>d</sup>	64 ± 5 <sup>d</sup>	21 ± 2 <sup>d</sup>
RC/EL-GMS	5,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	51 ± 5 <sup>bc</sup>	50 ± 5 <sup>a</sup>	267 ± 34 <sup>a</sup>	88 ± 11 <sup>a</sup>
G/EL-GMS	0,3 ± 0,0 <sup>d</sup>	10 ± 1 <sup>e</sup>	7 ± 1 <sup>e</sup>	3 ± 1 <sup>e</sup>	1 ± 0 <sup>e</sup>
M/EL-GMS	0,8 ± 0,1 <sup>c</sup>	61 ± 3 <sup>b</sup>	31 ± 2 <sup>c</sup>	48 ± 8 <sup>d</sup>	16 ± 3 <sup>d</sup>
Alm/EL-GMS	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	54 ± 1 <sup>bc</sup>	39 ± 4 <sup>b</sup>	265 ± 1 <sup>a</sup>	88 ± 0 <sup>a</sup>
Et/EL-GMS	0,3 ± 0,0 <sup>d</sup>	36 ± 4 <sup>cd</sup>	n.d.	11 ± 2 <sup>e</sup>	4 ± 1 <sup>e</sup>
EL-GMS	0,3 ± 0,0 <sup>d</sup>	19 ± 2 <sup>d</sup>	27 ± 3 <sup>cd</sup>	6 ± 1 <sup>e</sup>	2 ± 0 <sup>e</sup>

Dentro de una columna, las medidas sin una letra superíndice común difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

\*porcentaje en la biomasa.

#### *2.4.3 Efecto del medio de crecimiento sobre la composición de ácidos grasos (AG) producidos por traustoquitrídios nativos*

La composición de los AG producidos por las cepas *Thraustochytriidae* sp. C41, *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 y *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 en las fermentaciones de diferentes fuentes de carbono (residuos líquidos, glucosa, maltosa y almidón) suplementados con EL-GMS y fuente de nitrógeno son presentadas en las Tablas 2.5, 2.6 y 2.7, respectivamente. El ácido palmitico (C16:0) (24,9-30,9%) y DHA (18,4-27,1%) fueron los principales AG producidos por la cepa *Thraustochytriidae* sp. C41 (Tabla 2.5); el ácido araquidonico (ARA, C20:4n-6) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) representan entre 9,4 y 19,4% del total de los AG. Los ácidos grasos saturados de cadena impar (C15:0 y C17:0) tienen una mayor contribución en los AG en la biomasa proveniente de fermentaciones con glucosa (26,8%). El mayor contenido de AGPIs de cadena larga (39,2%) en los AGs se encontró en la biomasa producida en la fermentación con RC. Los AGs en la biomasa obtenida en las fermentaciones con RP1 contienen el porcentaje más alto de DHA (27,1%). Sin embargo, este porcentaje no fue significativamente diferente ( $p>0,05$ ) del valor correspondiente a la biomasa producida en las fermentaciones de RP2, glucosa y maltosa.

**Tabla 2.5.** Perfiles de ácidos grasos producidos por *Thraustochytriidae* sp. C41 crecida con diferentes fuentes de carbono y EL-GMS (medio de control).

Ácidos grasos (%)	RP1	RP2	RC	G	Alm	M	EL-GMS
C14:0	3,2±0,20 <sup>a,b</sup>	3,8±0,42 <sup>a</sup>	3,0±0,12 <sup>a,b</sup>	1,4±0,30	1,4±0,05	1,7±0,48	2,7±0,28 <sup>b</sup>
C15:0	8,5±0,36 <sup>c,d,e</sup>	10,3±2,84 <sup>b,c,d</sup>	4,7±0,53 <sup>c</sup>	15,0±0,30 <sup>a</sup>	13,5±2,70 <sup>a,b</sup>	7,7±0,07 <sup>d,e</sup>	12,2±0,25 <sup>a,b,c</sup>
C16:0 (palmitic acid)	27,5±2,80	30,4±2,09	30,9±2,95	25,0±0,50	27,3±4,50	24,9±3,00	25,5±1,44
C16:1	0,7±0,17	0,6±0,09	1,2±0,12				2,1±0,08
C17:0	4,5±0,17 <sup>b,c</sup>	5,4±1,91 <sup>b,c</sup>	3,1±0,36 <sup>c</sup>	11,8±0,90 <sup>a</sup>	13,0±2,10 <sup>a</sup>	5,2±0,06 <sup>b,c</sup>	6,6±0,63 <sup>b</sup>
C18:0	0,8±0,06	1,0±0,27	5,5±0,13		2,7±0,06	0,8±0,04	1,3±0,18
C18:1					1,3±0,04		3,2±0,28
C18:2					0,9±0,90		1,4±0,42
C20:4+C20:5 (AA+EPA)	18,4±0,37 <sup>a</sup>	16,0±2,98 <sup>a,b</sup>	15,2±1,34 <sup>a,b</sup>	14,0±0,80 <sup>b</sup>	9,4±0,80	19,4±0,48 <sup>a</sup>	16,9±1,90 <sup>a,b</sup>
C20:2			3,0±0,36				
C20:3			2,6±0,09				
C22:6 (DHA)	27,1±1,64 <sup>a</sup>	22,3±5,13 <sup>a,b,c</sup>	18,4±2,53 <sup>c</sup>	22,5±0,09 <sup>a,b,c</sup>	19,3±0,42 <sup>b,c</sup>	26,2±3,18 <sup>a,b</sup>	19,2±2,84 <sup>b,c</sup>
Otros	9,3±1,29	10,2±0,93	12,4±0,26	10,3±0,20	13,3±0,27	11,2±0,91	8,9±1,10

Dentro de una fila, las cantidades sin una letra superíndice común se diferencian significativamente ( $p<0,05$ ).

Los AGs producidos por la cepa M12-X1 (Tabla 2.6) contienen ácido palmítico (18,8-28,6%), EPA (7,4-11,3%) y DHA (31,5-61,7%). El mayor contenido de DHA (61,7%) fue encontrado en los AG de la biomasa crecida en EL-GMS; este contenido de DHA no fue

significativamente diferente ( $p>0,05$ ) al de los AGs provenientes de la biomasa producida en la fermentación de RP2. Para las cepas *Thraustochytriidae* sp. C41 y *Thraustochytriidae* sp. M12-X1, el contenido relativo de ácido palmítico y DHA en los AG presentan diferentes correlaciones con la concentración de biomasa (Tablas 2.2-2.5; 2.3-2.6); los AGs que provienen de altas concentraciones de biomasa contienen más ácido palmítico que los que provienen de bajas concentraciones de biomasa los cuales contienen más DHA.

Los perfiles de AG en la biomasa de la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 crecida en los medios basados en residuos (RP1, RP2 y RC) y fuentes puras de carbón (glucosa, almidón y maltosa), todas ellas suplementada con EL-GMS se muestran en la Tabla 2.7. El ácido palmítico (C16:0), DHA, ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1), y ácido linoléico (C18:2) fueron los principales AG producidos por la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1; en conjuntos representan más del 60% del total de AG. El contenido de DHA se encontró entre 10,1%, en la biomasa obtenida de la fermentación de RC y 23,4% en la biomasa de la fermentación de RP2. La contribución sumada de ácido araquidónico (C20:4 n-6, ARA) y ácido eicosapentanóico (C20:5 n-3, EPA) varió entre 2,9%, en la biomasa obtenida de la fermentación de fuentes de nitrógeno, y 12,8% en la biomasa obtenida desde la fermentación de maltosa. Correlaciones lineales negativas fueron detectadas entre las contribuciones sumadas de ácido esteárico – ácido oleico y ácido palmítico ( $R^2=0,684$ ) y entre el ARA - EPA y ácido palmítico ( $R^2=0,522$ ).

**Tabla 2.6.** Perfiles de ácidos grasos producidos por *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 crecida con diferentes fuentes de carbono y EL-GMS (medio de control).

Ácidos grasos (%)	RP1	RP2	RC	G	Alm	M	EL-GMS
C:6 (ácido adípico)					24,9±4,04		
C12:0	0,4±0,06	0,9±0,14	0,5±0,07	0,5±0,03			0,8±0,01
C14:0	3,1±0,39 <sup>b</sup>	4,1±0,26 <sup>a</sup>	4,4±0,03 <sup>a</sup>	4,6±0,17 <sup>a</sup>	2,3±0,25 <sup>c</sup>	4,0±0,21 <sup>a</sup>	2,8±0,04 <sup>b,c</sup>
C15:0	4,7±0,74 <sup>b</sup>	2,6±0,35 <sup>c</sup>	1,1±0,01	7,2±0,12 <sup>a</sup>	2,2±0,20 <sup>c</sup>	5,4±0,38 <sup>b</sup>	3,1±0,30 <sup>c</sup>
C16:0 (a. palmitico)	23,8±3,21 <sup>b</sup>	22,1±0,70 <sup>b,c</sup>	28,6±0,36 <sup>a</sup>	24,2±0,43 <sup>b</sup>	21,7±1,03 <sup>b,c</sup>	28,5±0,40 <sup>a</sup>	18,8±1,30 <sup>c</sup>
C16:1			0,6±0,11				
C17:0							0,3±0,04
C18:0	0,6±0,18 <sup>b</sup>	0,6±0,09 <sup>b</sup>	2,9±0,17	1,4±0,11 <sup>a</sup>	1,1±0,08 <sup>a</sup>	1,1±0,23 <sup>a</sup>	0,3±0,03 <sup>b</sup>
C18:1				0,9±0,15		1,1±0,18	1,2±0,09
C18:2				1,1±0,04		1,7±0,10	0,3±0,04
C20:3			1,0±0,06				
C20:5 (EPA)	11,3±0,29 <sup>a</sup>	10,2±0,94 <sup>b,c</sup>	10,6±0,03 <sup>a,b</sup>	9,9±0,01 <sup>b,c</sup>	7,4±0,18	9,5±0,12 <sup>c</sup>	10,8±0,06 <sup>a,b</sup>
C22:6 (DHA)	53,1±3,45 <sup>b,c</sup>	57,3±1,19 <sup>a,b</sup>	44,7±0,11 <sup>d,e</sup>	44,1±0,07 <sup>d,e</sup>	39,5±4,90 <sup>e</sup>	47,3±0,58 <sup>c,d</sup>	61,7±3,30 <sup>a</sup>
Otros	3,0±0,83	2,2±0,54	5,6±0,42	6,1±0,13	0,98±0,16	1,3±0,66	

Dentro de una fila, las cantidades sin una letra superíndice común se diferencian significativamente ( $p<0,05$ ).

**Tabla 2.7.** Perfiles de ácidos grasos producidos por *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 crecida con diferentes fuentes de carbono y EL-GMS (medio de control).

Ácidos grasos (%)	RP1	RP2	RC	G	Alm	M	EL-GMS
C12:0	3,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>	1,0 ± 0,5 <sup>bc</sup>	2,1 ± 1,3 <sup>ab</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>bc</sup>	3,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
C14:0	2,5 ± 0,4 <sup>bc</sup>	1,9 ± 0,6 <sup>cd</sup>	2,3 ± 0,0 <sup>c</sup>	1,6 ± 0,0 <sup>d</sup>	2,1 ± 0,0 <sup>cd</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,0 <sup>a</sup>
C15:0	2,0 ± 0,8 <sup>c</sup>	2,8 ± 0,7 <sup>bc</sup>	4,3 ± 0,7 <sup>b</sup>	4,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,7 <sup>bc</sup>	11,5 ± 1,1 <sup>a</sup>
C16:0	37,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	34,6 ± 2,8 <sup>a</sup>	17,4 ± 1,1 <sup>b</sup>	22,6 ± 2,1 <sup>b</sup>	19,2 ± 1,6 <sup>b</sup>	21,2 ± 1,5 <sup>b</sup>	34,5 ± 5,8 <sup>a</sup>
C17:0	0,9 ± 0,6 <sup>c</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>bc</sup>	6,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,7 <sup>b</sup>	6,6 ± 1,0 <sup>a</sup>
C18:0	9,2 ± 0,5 <sup>c</sup>	9,8 ± 1,0 <sup>c</sup>	13,2 ± 1,1 <sup>ab</sup>	15,6 ± 2,3 <sup>a</sup>	9,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	11,6 ± 0,7 <sup>bc</sup>	11,5 ± 0,5 <sup>bc</sup>
C18:1	7,6 ± 0,7 <sup>c</sup>	7,6 ± 0,6 <sup>c</sup>	11,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	6,8 ± 1,6 <sup>c</sup>	17,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	4,5 ± 0,5 <sup>d</sup>
C18:2	6,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	6,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	12,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,8 ± 2,1 <sup>b</sup>	6,6 ± 0,3 <sup>bc</sup>	5,8 ± 0,9 <sup>c</sup>	4,2 ± 1,1 <sup>c</sup>
C20:2	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	1,3 ± 0,5 <sup>c</sup>	1,3 ± 0,0 <sup>c</sup>
C20:3	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,3 <sup>b</sup>
C20:4+C20:5	7,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	8,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	6,4 ± 0,4 <sup>c</sup>	6,7 ± 0,2 <sup>c</sup>	6,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	12,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,8 <sup>d</sup>
C22:6	21,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	23,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	10,1 ± 1,7 <sup>de</sup>	15,1 ± 4,6 <sup>bc</sup>	13,7 ± 0,2 <sup>cd</sup>	19,6 ± 0,1 <sup>ab</sup>	7,5 ± 1,5 <sup>e</sup>
Otros	1,8 ± 1,1 <sup>d</sup>	1,6 ± 0,9 <sup>d</sup>	10,5 ± 0,2 <sup>ab</sup>	6,8 ± 0,5 <sup>c</sup>	11,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	8,9 ± 0,2 <sup>bc</sup>	7,0 ± 1,4 <sup>c</sup>

Dentro de una fila, las cantidades sin una letra superíndice común se diferencian significativamente ( $p<0,05$ ).

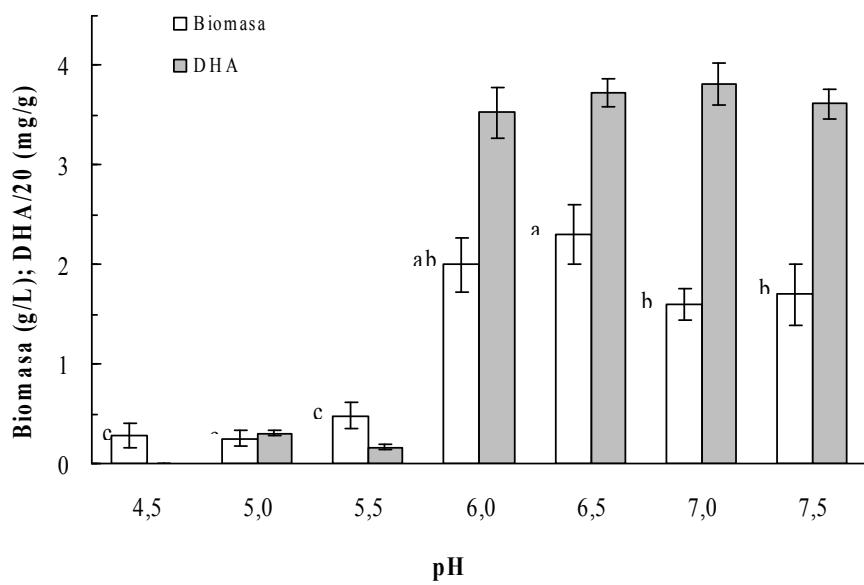
De acuerdo a los resultados mostrados en las Tablas 2.3 y 2.4, el medio de cultivo con el mayor potencial para la producción de DHA por las cepas *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 y *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 es aquel en el cual RC fue utilizado como fuente de carbono; por lo tanto se realizaron experimentos con el fin de aumentar la productividad

de DHA en su fermentación. El flujo de actividades desarrolladas y el resultado de esta etapa se muestran en la Figura 2.8.

#### *2.4.4 Producción de DHA en medio de cultivo basado en el subproducto de la fabricación de la cerveza (RC) por la cepa *Thraustochytriidae* sp. M12-X1.*

El efecto del pH inicial del medio RC-EL-GMS sobre la biomasa y producción de DHA por la cepa *Thraustochytriidae* sp. M12-X se presenta en la Figura 2.1. Una muy baja concentración de biomasa (<0,5 g/L) se obtuvo cuando el pH inicial del medio fue inferior a 5,5. Por otro lado, las diferencias en la concentración de biomasa y contenido de DHA en la biomasa (70-76 mg/g) en las fermentaciones realizadas con pH inicial de 6,0 y 6,5 no fueron significativas ( $p>0,05$ ).

Se realizaron experimentos para probar el efecto de la concentración sobre la productividad de DHA de las fermentaciones de RC por la cepa *Thraustochytriidae* sp. M12-X1. En estas fermentaciones el medio RC fue utilizado como única fuente de carbono y nitrógeno. Los resultados se presentan en la Tabla 2.8, en ella se muestra que mientras la concentración de RC decrece, la concentración de biomasa cae linealmente ( $R^2=0,988$ ). En la fermentación de RC al 100% v/v la concentración de biomasa fue 1,7 g/L, el mismo valor obtenido en la fermentación del medio RC-EL (Tabla 2.3). El contenido de DHA en la biomasa crecida en RC al 40% v/v fue significativamente más alta (38,3 mg/g), aunque la más alta productividad de DHA (10,4 mg/L/día) fue obtenida en la fermentación del medio RC al 80% v/v.



**Figura 2.1.** Efecto del pH inicial del medio de cultivo RC-EL-GMS en la concentración de biomasa y contenido de DHA en la biomasa de la cepa *Thraustochytriidae* sp. M12-X1.

Los cambios en la concentración de biomasa y el contenido de DHA y AG totales en la biomasa fueron seguidos durante la fermentación del medio RC-EL-GMS por la cepa *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 (Figura 2.2). El mayor contenido de AG totales (41,3%) en la biomasa fue alcanzado después de tres días. La concentración de biomasa (2,3 g/L) y su contenido de DHA (91,6 mg/g) alcanzaron los mayores valores después de cuatro días. Al mismo tiempo la DQO decreció desde 34.900 mg/L a 31.517 mg/L. Los coeficientes de rendimiento para la producción de biomasa sobre DQO ( $Y_{\text{Biomasa/DQO}}$ ) y para la producción de DHA sobre DQO ( $Y_{\text{DHA/DQO}}$ ) fueron 0,559 g/g and 0,054 g/g, respectivamente. Durante este periodo, el contenido de carbohidratos totales (CHT) decreció desde 25,3 a 10,9 g/L; así los coeficientes para la producción de biomasa sobre CHT ( $Y_{\text{biomass/CHT}}$ ) y para la

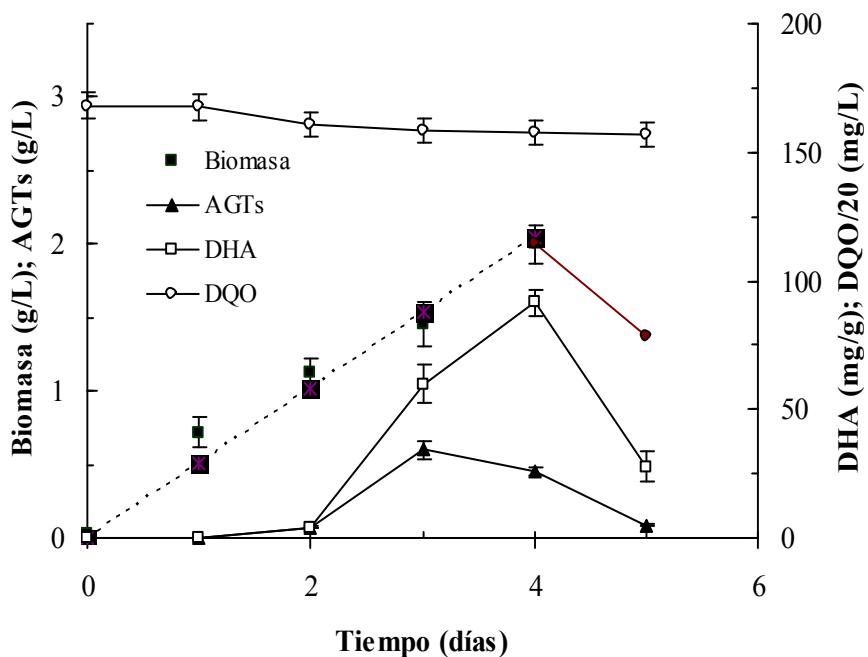
producción de DHA sobre CHT ( $Y_{DHA/CHT}$ ) fueron 0,14 g/g y 0,0127 g/g, respectivamente.

La duración del periodo de crecimiento aritmética fue de 4 días, durante el cual la concentración de biomasa aumenta a una velocidad de 0,51 g/día.

**Tabla 2.8.** Efecto de la concentración del subproducto de fabricación de la cerveza (RC) en las concentraciones de biomasa y DHA, contenido de DHA en la biomasa y Productividad de DHA ( $P_{DHA}$ ) de las fermentaciones por *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 (4 d, matraces erlenmeyer).

RC (% v/v)	Biomasa (g/L)	DHA (mg/g)	DHA (mg/L)	$P_{DHA}$ (mg/L/día)
100	1,7 ± 0,20 <sup>a</sup>	16,0 ± 1,5 <sup>c</sup>	27,4 ± 1,5 <sup>a,b</sup>	9,1 ± 0,5 <sup>a,b</sup>
80	1,4 ± 0,60 <sup>a,b</sup>	22,8 ± 1,3 <sup>b</sup>	31,2 ± 2,8 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,9 <sup>a</sup>
40	0,6 ± 0,04 <sup>b,c</sup>	38,3 ± 2,2 <sup>a</sup>	24,0 ± 2,8 <sup>b</sup>	8,0 ± 0,9 <sup>b</sup>
10	0,3 ± 0,01 <sup>c</sup>	18,2 ± 3,5 <sup>b,c</sup>	5,6 ± 1,4	1,9 ± 0,5

Dentro de una columna, las medidas sin una letra superíndice común difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

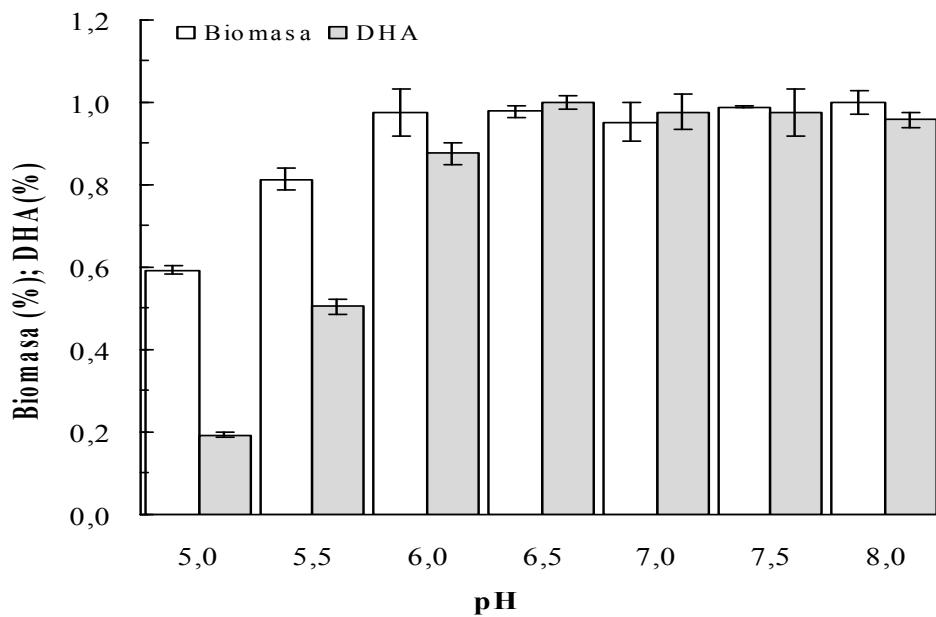


**Figura 2.2.** Concentración de biomasa, AGTs y contenido de DHA en la biomasa de la cepa *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 y DQO durante la fermentación en el medio RC-EL-GMS. pH inicial 6,5; temperatura 25 °C. La línea de puntos representa la biomasa en el período de crecimiento aritmética (pendiente=0,51 g/día).

#### 2.4.5 Producción de DHA y ASX en medio de cultivo basado en el subproducto de la fabricación de la cerveza (RC) por la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1.

El primer efecto examinado fue el pH; los resultados de los experimentos realizados con diferentes pH iniciales (entre 5 y 8) se muestran en la Figura 2.3. En las fermentaciones de 5 días, valores de pH iniciales inferiores a 6, afectaron negativamente la producción de biomasa y la concentración DHA. Por otro lado, cuando el pH inicial fue entre 6 y 8, las diferencias en biomasa y concentración de DHA no fueron significativas ( $p>0,05$ ); los

valores promedios fueron  $5\pm0,1$  g/L y  $704\pm35$  mg/L, respectivamente. En los siguientes experimentos el pH inicial del medio de cultivo basado en RC fue fijado a 7.



**Figura 2.3.** Efecto del pH inicial del medio basado en RC fermentado por *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 en la concentración de biomasa y DHA. Los valores son porcentajes de la concentración máxima (biomasa, 7,7 g/L; DHA, 0,74 g/L).

El efecto de la concentración del residuo (10%-100% v/v) en la productividad de DHA de las fermentaciones de RC, como la única fuente de nutrientes, fue el segundo efecto evaluado (Tabla 2.9) La concentración de biomasa presentó un incremento lineal

( $R^2=0.984$ ) a medida que la concentración del residuo aumentaba. Sin embargo, el mayor contenido de DHA en la biomasa ( $58 \pm 1$  mg/g) se obtuvo en la fermentación de RC al 40% v/v, aunque el valor obtenido no fue significativamente diferente ( $p > 0,05$ ) al obtenido con la concentración más alta del residuo.

**Tabla 2.9.** Efecto de la concentración de RC en las concentraciones de biomasa, DHA, contenido de DHA en la biomasa y Productividad de DHA de las fermentaciones de *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1.

RC (%)	Biomasa (g/L)	DHA (mg/g)	DHA (mg/L)	P <sub>DHA</sub> (mg/L/día)
100	$9,0 \pm 0,7^a$	$55 \pm 2^a$	$497 \pm 21^a$	$99 \pm 38^a$
80	$8,4 \pm 0,0^b$	$42 \pm 4^b$	$352 \pm 29^b$	$70 \pm 28^b$
40	$4,5 \pm 0,4^c$	$58 \pm 1^a$	$260 \pm 15^c$	$52 \pm 20^c$
10	$2,1 \pm 0,1^d$	$50 \pm 0^c$	$104 \pm 2^d$	$21 \pm 8^d$

<sup>a</sup>Dentro de una columna, las medidas sin una letra superíndice común difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

A través del incremento de la concentración de RC, fue posible aumentar la productividad en DHA alcanzando un valor de  $99 \pm 4$  (mg/L/día). Por otro lado, la mejor

condición para la producción de ASX ( $57 \pm 3$  mg/L/día) fue obtenida en la fermentación de RC al 80% v/v (Tabla 2.10).

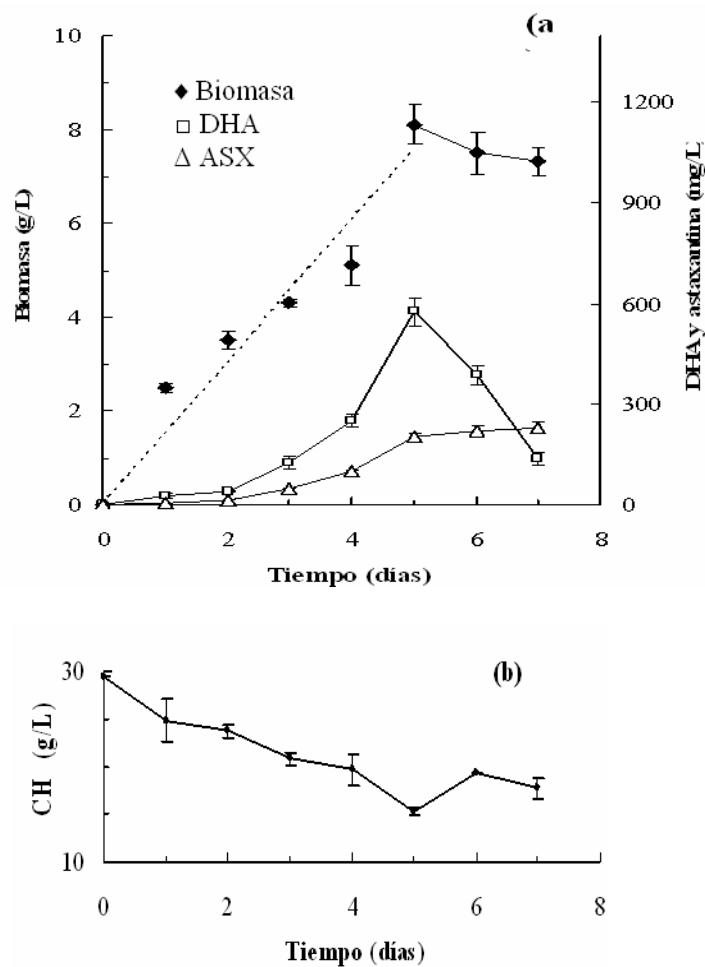
**Tabla 2.10.** Efecto de la concentración de RC en las concentraciones de biomasa, astaxantina (ASX), contenido ASX en la biomasa y Productividad de ASX de las fermentaciones de *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1.

RC (%v/v)	Biomasa (g/L)	ASX (mg/g)	ASX (mg/L)	P <sub>ASX</sub> (mg/L/día)
100	$9,0 \pm$ 0,7 <sup>a</sup>	$35 \pm$ 5 <sup>a</sup>	$317 \pm$ 80 <sup>a</sup>	$63 \pm$ 16 <sup>a</sup>
80	$8,4 \pm$ 0,0 <sup>b</sup>	$34 \pm$ 2 <sup>a</sup>	$284 \pm$ 13 <sup>a</sup>	$57 \pm$ 3 <sup>a</sup>
40	$4,5 \pm$ 0,4 <sup>c</sup>	$29 \pm$ 0 <sup>a</sup>	$129 \pm$ 17 <sup>b</sup>	$26 \pm$ 3 <sup>b</sup>
10	$2,1 \pm$ 0,1 <sup>d</sup>	$21 \pm$ 1 <sup>b</sup>	$43 \pm$ 0 <sup>b</sup>	$9 \pm$ 0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Dentro de una columna, las medidas sin una letra superíndice común difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

A partir de los datos de la curva de crecimiento mostrada en la Figura 2.4 se calcularon la velocidad de crecimiento y el rendimiento total de carbohidratos en productos en la fermentación de RC como única fuente de nutrientes. La biomasa y concentración de DHA presentaron valores máximos de  $8,1 \pm 0,4$  g/L y  $575 \pm 40$  mg/L, respectivamente, después de 5 días (Figura 2.4a). Las incubaciones prolongadas favorecieron la producción

de ASX y en el día 7 su concentración fue de  $230 \pm 15$  mg/L. Sólo una fracción del total de carbohidratos (48%) fueron consumidos por la cepa AS4-A1 (Figura 2.4b). Al día 5, el rendimiento de carbohidratos a biomasa ( $Y_{\text{biomasa/CHT}}$ ), DHA ( $Y_{\text{DHA/CHT}}$ ) y a ASX ( $Y_{\text{ASX/CHT}}$ ), fue estimado en 0,57 g/g, 40,8 mg/g y 14,3 mg/g, respectivamente. La duración del periodo de crecimiento aritmética fue de 5 días, durante el cual la concentración de biomasa aumentó a una velocidad de 1,51 g/día.



**Figura 2.4.** Perfiles de las (a) concentraciones de biomasa, DHA, ASX y (b) concentraciones de CHT en la fermentación basada en el medio RC por *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1. La línea de puntos representa la biomasa en el período de crecimiento aritmético (pendiente=1,51 g/día).

Para continuar los estudios con el fin de aumentar la productividad de DHA en las fermentaciones, la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 fue seleccionada de acuerdo a los resultados mostrados en las Figuras 2.2 y 2.4a, los que se resumen como mayor potencial para la producción de DHA y adicionalmente la cepa produce astaxantina. La Figura 2.8 muestra el flujo de las actividades desarrolladas y el resultado obtenido para esta etapa.

Dado que los resultados en la Tabla 2.4 muestran que la adición de GMS al medio basado en RC, tiene un efecto tanto en la concentración de la biomasa como en el contenido de DHA en la biomasa, se realizaron experimentos para probar sus efectos por separado con diferentes concentraciones de EL (0 – 2 g/L) y GMS (0 – 2 g/L) después de 5 días de incubación. Los resultados (Tabla 2.11) muestran un efecto negativo del EL en la concentración de biomasa; 4,8±0,1 g/L de biomasa seca fueron obtenidos en fermentaciones de RC/EL comparada con 9,0±0,7 g/L en la fermentación de RC puro. Sin embargo, la biomasa que crece en el medio suplementado con EL contiene significativamente más DHA (96±8 mg/g), en comparación con la obtenida en la fermentación de RC puro (55±2 mg/g). La fermentación que exhibió la mayor productividad de DHA (187±5 mg/L/día) fue la del medio basado en RC con EL y GMS (RC-EL-GMS).

El contenido de ASX en la biomasa se incrementó ligeramente ( $39 \pm 6$  mg/g) después que el medio basado en RC se suplementará con GMS, sin embargo, la mayor productividad de ASX ( $63 \pm 3$  mg/L/día) se obtuvo en la fermentación de RC puro (Tabla 2.12).

**Tabla 2.11.** Efecto de las concentraciones de extracto de levadura (EL) y glutamato monosodico (GMS) en medio basado en RC sobre la concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa, y productividades de DHA de fermentaciones de *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1.

EL (g/L)	GMS (g/L)	C: N	Biomasa (g/L)		DHA (mg/g)		P <sub>DHA</sub> (mg/L/día)	
0	0	49,0	$9,0 \pm$	0,7 <sup>a</sup>	$55 \pm$	2 <sup>c</sup>	$99 \pm$	4 <sup>b</sup>
2	0	32,0	$4,8 \pm$	0,1 <sup>c</sup>	$96 \pm$	8 <sup>b</sup>	$92 \pm$	9 <sup>b</sup>
0	2	35,8	$7,6 \pm$	0,3 <sup>b</sup>	$50 \pm$	4 <sup>c</sup>	$75 \pm$	9 <sup>c</sup>
2	2	26,2	$8,0 \pm$	0,0 <sup>ab</sup>	$117 \pm$	4 <sup>a</sup>	$187 \pm$	5 <sup>a</sup>

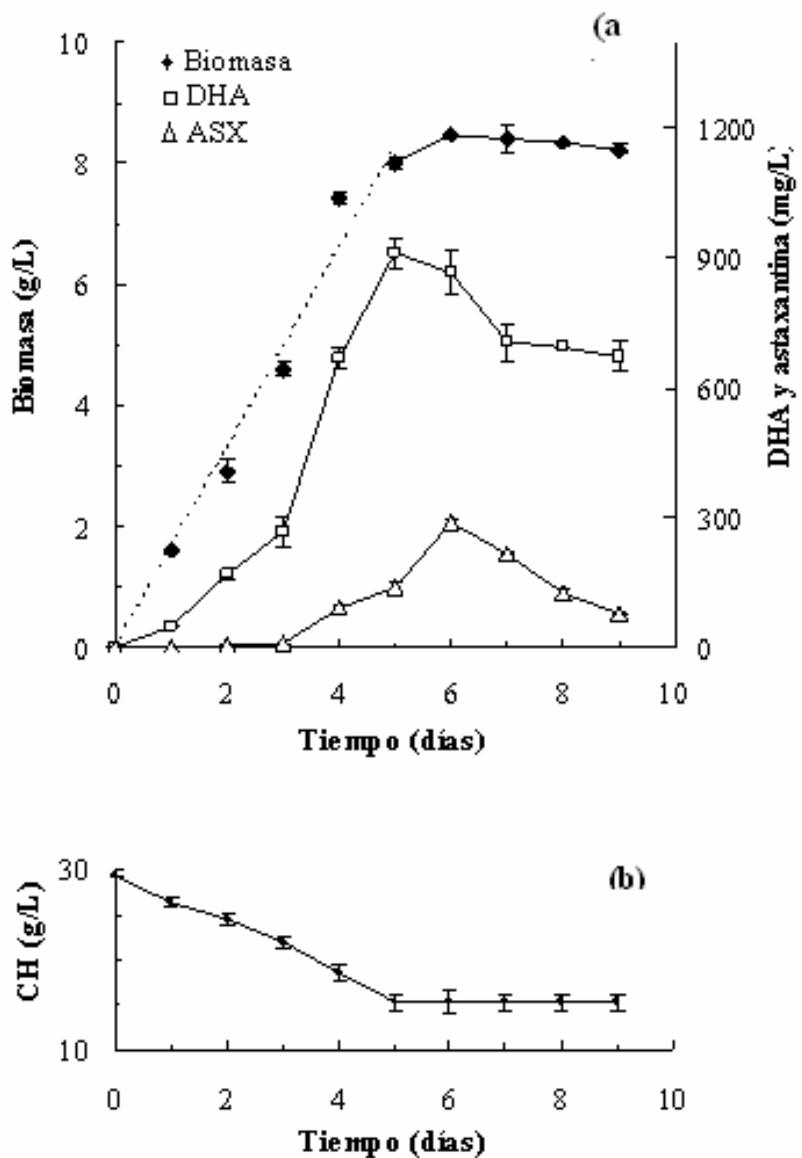
Dentro de una columna, las medidas sin una letra superíndice común difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.12.** Efecto de las concentraciones de extracto de levadura (EL) y glutamato monosodico (GMS) en medio basado en RC sobre la concentración de biomasa, contenido de ASX en la biomasa, y productividades de ASX de fermentaciones de *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1.

EL (g/L)	GMS (g/L)	C: N	Biomasa (g/L)		ASX (mg/g)		$P_{ASX}$ (mg/L/día)	
			9,0 ±	0,7 <sup>a</sup>	35 ±	2 <sup>a</sup>	63 ±	3 <sup>a</sup>
0	0	49,0	9,0 ±	0,7 <sup>a</sup>	35 ±	2 <sup>a</sup>	63 ±	3 <sup>a</sup>
2	0	32,0	4,8 ±	0,1 <sup>c</sup>	2 ±	0 <sup>c</sup>	1 ±	0 <sup>c</sup>
0	2	35,8	7,6 ±	0,3 <sup>b</sup>	39 ±	6 <sup>a</sup>	58 ±	10 <sup>a</sup>
2	2	26,2	8,0 ±	0,0 <sup>ab</sup>	15 ±	3 <sup>b</sup>	24 ±	4 <sup>b</sup>

Dentro de una columna, las medidas sin una letra superíndice común difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

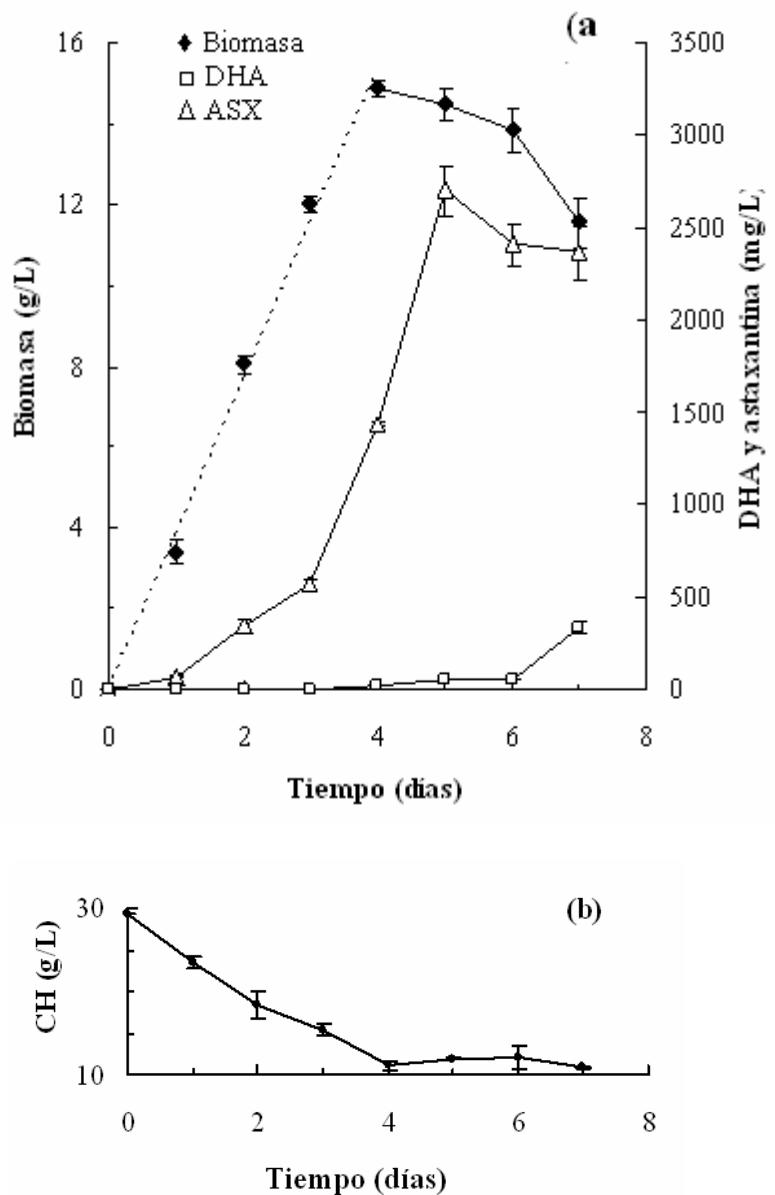
Los cambios en la concentración de biomasa y en las concentraciones de DHA y ASX fueron seguidos en la fermentación de RC suplementado con EL y GMS, ambos a concentraciones de 2 g/L (Figura 2.5). En este caso las mayores concentraciones de biomasa ( $8,5 \pm 0,1$  g/L) y ASX ( $288 \pm 8$  mg/L) fueron alcanzadas en el día 6, mientras que la mayor concentración de DHA ( $913 \pm 37$  mg/L) fue alcanzada el día 5 (Figura 2.5a). El consumo de hidratos de carbono no se vio afectado por la adición de nitrógeno (Figura 2.5b); por lo tanto, los valores de  $Y_{\text{biomasa/CHT}}$  (0,60 g/g) y  $Y_{\text{DHA/CHT}}$  (64,6 mg/g) fueron superiores a los valores obtenidos en la fermentación de RC puro, mientras que  $Y_{\text{ASX/CHT}}$  (9,7 mg/g) fue menor. En este medio de crecimiento la concentración de biomasa aumentó hasta el día 5 a una velocidad de 1,65 g/día.



**Figura 2.5.** Perfiles de las (a) concentraciones de biomasa, DHA, ASX y (b) concentración de CHT en la fermentación en el medio basado en RC suplementado con EL y GMS 2 g/L por *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1. La línea de puntos representa la biomasa en el período de crecimiento aritmética (pendiente=1,65 g/día).

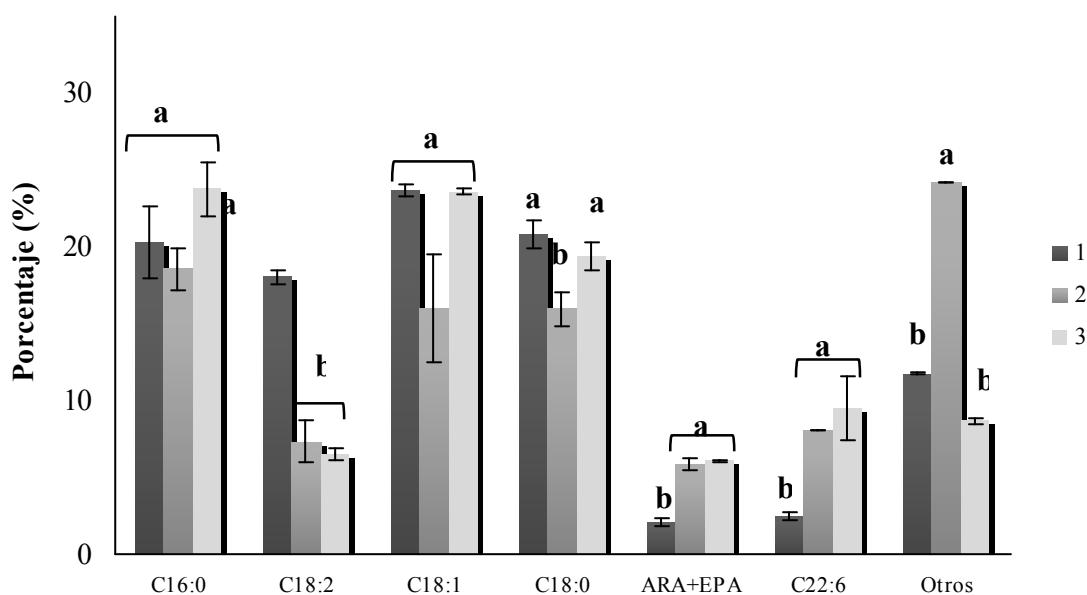
La Figura 2.6 a muestra los cambios en la biomasa y en las concentraciones de DHA y ASX en medios de RC-EL-GMS complementados con vitaminas del grupo B. La mayor biomasa ( $14,5 \pm 0,4$  g/L) y la mayor concentración de DHA ( $2698 \pm 132$  mg/L) fueron alcanzadas después de 4 y 5 días, respectivamente. La producción de ASX que comenzó después del segundo día, aumentó de forma constante hasta el día 7 alcanzando una concentración de  $333 \pm 29$  mg/L. El consumo de hidratos de carbono (63%) fue favorecido a través del complemento de vitaminas B (Figura 2.6 b). Los valores de los coeficientes de rendimiento de  $Y_{\text{biomasa}/\text{CHT}}$  y  $Y_{\text{DHA}/\text{CHT}}$  fueron 0,82 g/g y 78,6 mg/g, superiores a aquellos obtenidos en las fermentaciones de RC y RC/EL-GMS; por el contrario el menor valor de  $Y_{\text{ASX}/\text{CHT}}$  (1,3 mg/g) se obtuvo bajo estas condiciones de crecimiento.

La duración del período de crecimiento aritmético se redujo a 4 días (Figura 2.4 a), durante el cual la concentración de biomasa aumentó a una velocidad de 3,83 g/día.



**Figura 2.6.** Perfiles de las (a) concentraciones de biomasa, DHA, ASX y (b) concentración de CHT en la fermentación en el medio basado en RC suplementado con EL y GMS 2 g/L y vitamina por *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1. La línea de puntos representa la biomasa en la fase de crecimiento aritmética (pendiente=3,83 g/día).

En la Figura 2.7 se comparan los contenidos de los principales AGs en la biomasa cultivada en RC, RC/EL-GMS y RC/EL-GMS más vitaminas B, al momento en el cual se obtuvo la mayor concentración de biomasa. El contenido de ácidos palmítico y oleico, no fueron significativamente diferentes ( $p>0,05$ ) en la biomasa cultivada en los diferentes medios de cultivo. Sin embargo, diferencias significativas ( $p<0,05$ ) fueron detectadas en los contenidos de ácido linoleico, DHA, ARA+EPA; el contenido de ácido linoleico fue mayor en la biomasa cultivada en RC, mientras que el contenido de los otros ácidos grasos fue mayor en la biomasa cultivada en el medio RC suplementado.



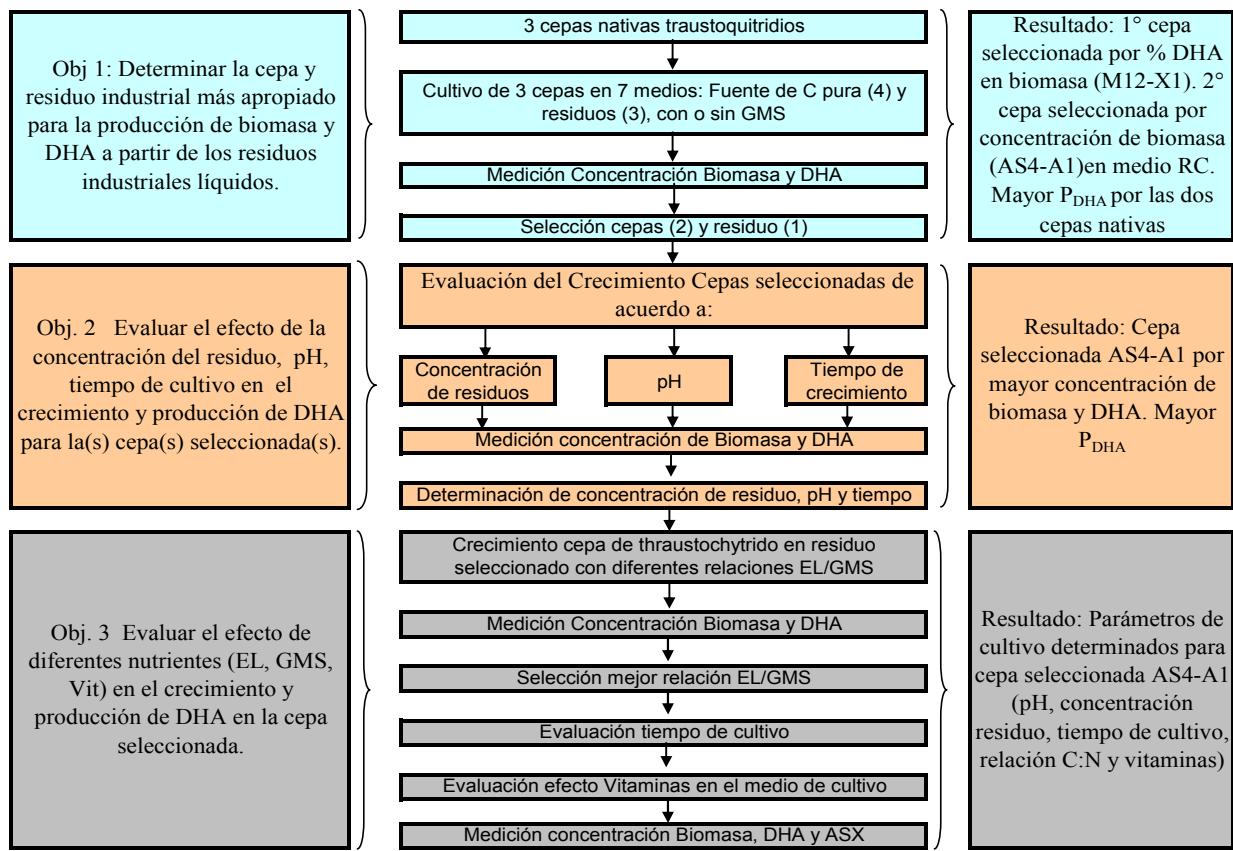
**Figura 2.7.** Comparación de los principales AGs producidos por *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 crecido en (1) RC, (2) RC/EL-GMS y (3) RC/EL-GMS más vitaminas B en el momento en que se obtuvo la mayor concentración de biomasa. Una letra diferente en una columna cercana indica que ese valor difiere significativamente ( $p<0,05$ ).

#### *2.4.6. Morfología e identificación genética de la cepa Thraustochytriidae sp. AS4-1.*

De acuerdo a la secuencia del 18S ADNr, *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 es similar a *Ulkenia* sp. (99%). Los siguientes caracteres morfológicos se observaron durante el crecimiento de la cepa AS4-A1 en placas de agar: las colonias eran pequeñas exhibiendo una textura cremosa a dura y en los cultivos más antiguos presentaban una coloración rosada a rojo, generación de elementos de la red ectoplasmática no se detectaron. La cepa desarrolló un esporangio grande (mayor de 50 micras), a veces el esporangio tomó la forma de una ameba después que las zooporas fueron liberadas través de un poro; las zoosporas también fueron liberadas cuando el zoosporangio fue redondo. Se observó la desintegración parcial de la pared celular después que las zoosporas fueron liberadas, característica descrita para las cepas del género *Ulkenia* (Yokoyama et al, 2007).

Finalmente, la figura 2.8 muestra un resumen del flujo de actividades desarrolladas asociada a los objetivos y los resultados obtenidos en cada etapa.

**Obj General Establecer la capacidad de crecimiento y producción de DHA por cepas nativas de la familia Thraustochytriaceae en residuos líquidos de la industria alimentaria.**



**Figura 2.8** Modelo utilizado y flujo de actividades del desarrollo de la investigación propuesta.

## 2.5 Discusión

Las cepas bajo estudio, C41 similar a *Schizochytrium minutum* (97% identidad), M12-X1 similar a *Thraustochytrium kinnei* (99% identidad) y AS4-A1 similar a *Ulkenia* (99% identidad) producen lípidos con diferentes perfiles de AG, característica que ha sido sugerida para agrupar estos microorganismos (Huang et al. 2003). Los AGPIs de cadena larga producidos por las cepas Thraustochytriidae sp C41, M12-X1 y AS4-A1 son AA/EPA/DHA; EPA/DHA y AA/EPA/DHA, respectivamente; el contenido relativo de estos AGPI es afectado por la fuente de carbono. Las fuentes de carbono que permiten alto contenido de DHA en los AGs de Thraustochytriidae sp C41, M12-X1 y AS4-A1 son RP1 y RP2, respectivamente.

La composición de los residuos líquidos evaluados influyó en la producción de biomasa por las cepas nativas de traustoquitridos. La mayor concentración de biomasa fue obtenida en la fermentación del subproducto de la fabricación de la cerveza (RC) caracterizado por un mayor contenido de proteínas, E.N.N, y CHT. Además, la adición de GMS permitió incrementar la productividad de DHA en la fermentación de RC por las cepas Thraustochytriidae sp C41 M12-X1 y AS4-A1. La productividad de DHA de esta fermentación (por ambas cepas) fue mayor que la correspondiente a la fermentación de G, M y Alm, resultados que sugieren que RC contiene co-factores de crecimiento necesarios para estos microorganismos heterotróficos tales como fosfato, calcio, Mg, Mn y Fe.

El crecimiento de la cepa Thraustochytriidae sp C41 M12-X no es inhibido por las concentraciones de RC y probablemente se puede obtener mayor concentración de biomasa después de una etapa de concentración del residuo. Sin embargo, la concentración de RC a la cual se obtiene la mayor productividad de DHA es menor a aquella que permite la

mayor producción de biomasa. De esta forma el contenido de DHA en los AG sería una función de la producción de biomasa y de la velocidad a la que ésta crece. Los experimentos realizados para estudiar el efecto de la fuente de carbono sobre el perfil de AG de las cepas nativas C41 y M12-X1 mostró que se produce más ácido palmítico bajo condiciones que favorecen la producción de biomasa mientras que más DHA es producido bajo condiciones en las cuales se produce menos biomasa. Este comportamiento sugiere la posibilidad de favorecer la producción de biomasa o acumulación de DHA a través de cambios en la composición del medio de crecimiento o en la concentración de la fuente de carbono utilizando fermentaciones por lote-alimentado. Por otro lado, las condiciones de crecimiento podrían ser controladas para evitar la detención del crecimiento de la biomasa, ya que una vez que finaliza el periodo de crecimiento los AGTs y contenido de DHA en la biomasa disminuyen significativamente (Figura 2.2). Este decrecimiento podría ser explicado por el consumo de los lípidos en microorganismos oleaginosos que ocurre después que la fuente de carbono se ha agotado (Fakas et al. 2007). El perfil de AGs producidos por la cepa *Thraustochytriidae* sp C41 se caracteriza por la presencia del ácido palmítico y DHA como los principales ácidos grasos producidos; la presencia de ácidos grasos saturados de cadena impar (C:15, C:17) tienen una mayor contribución en los AGs en la biomasa proveniente de las diferentes fermentaciones a diferencia de la composición de AG de la cepa *Thraustochytriidae* sp M12-X1 que la presencia de AG cadena impar es de muy baja contribución, especialmente C:17.

La baja dismución de la DQO (9,7%) durante el período de crecimiento en la fermentación de RC por la cepa *Thraustochytriidae* sp M12-X1 indicaría que el crecimiento

está limitado por algún nutriente o que esta cepa es capaz de utilizar una pequeña fracción del carbono en RC.

Durante la fermentación de RC por la cepa *Thraustochytriidae* sp M12-X1, se obtienen compuestos de mayor valor, como los lípidos y DHA, y el DQO disminuye; la incubación prolongada (7 días) permitió una mayor disminución de la DQO (27,6%) con una significativa reducción de la productividad de DHA. El proceso descrito para la cepa *Thraustochytriidae* sp M12-X1 podría ser una alternativa para la producción de biodiesel por su biomasa rica en AG (41.3%) la cual es obtenida después de los tres días. Esta biomasa podría también ser utilizada en la formulación de dietas para peces y larvas de crustáceos por su alto contenido de AGPIs esenciales.

La cepa nativa *Thraustochytriidae* sp AS4-A1 presenta una alta similitud con el género *Ulkenia* sp. (99%); para cepas de este género existen pocos trabajos que describan la producción de DHA o sus características de crecimiento. Fan et al. (2001) informaron para la cepa *Ulkenia* sp KF14 una concentración de biomasa y contenido de DHA en la biomasa de 4,7 g/L y 5,5 mg/g respectivamente, en la fermentación de un medio compuesto por glucosa y EL. En la fermentación de un medio más complejo (fósfato de potasio, 3 g/L; sulfato de amonio, 2 g/L; licor de maíz, 0.7 g/L; glucosa, 60 g/L) por *Ulkenia* sp. SAM 2179 Tanaka et al. (1999) obtuvieron 19,5 g/L de biomasa con 46,2% de DHA en los AGs. Al contrario de las cepas KF13 y SAM 2179, la cepa nativa AS4-A1 no crece en glucosa a una concentración de 20 g/L (Tabla 2.4). Probablemente a esta concentración se inhibe el crecimiento y se debiera evaluar el efecto de la concentración. La mejor fuente de carbono para la producción de biomasa por la cepa *Thraustochytriidae* sp AS4-A1, es el almidón. Entre los residuos evaluados, el proveniente del procesamiento de cerveza (RC) es el que

tiene el mayor contenido de carbohidratos (29,1 g/L), lo que explicaría la mayor concentración de biomasa obtenida en esta fermentación. La similitud de los resultados obtenidos de las fermentaciones en RC y en almidón sugiere que la fracción de carbohidratos en RC utilizado por el microorganismo sería la correspondiente al almidón.

El perfil de AGs producidos por la cepa nativa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 se caracteriza por un alto contenido de ácidos esteárico, oleico y linoleico (20,2-37,5%), cuya contribución relativa depende de la composición del medio de cultivo (fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas). Por otra parte, el perfil de AGs producido por la cepa *Thraustochytriidae* sp AS4-A1 es más complejo que los de *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 y C41. La complejidad del perfil de AG de la cepa nativa AS4-A1 es coincidente con la informada para la cepa KF13 caracterizado por el contenido de ácido esteárico (11,7%), ácido oleico (18,2%), ácido linoleico (4,3%) y ácido linolenico (0,5%) (Fan et al. 2001). El contenido de estos AGs podría ser un rasgo distintivo entre las cepas *Ulkenia* y permitiría diferenciarlas de cepas *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*.

La suplementación con nitrógeno (EL-GMS) del medio de cultivo basado en RC permitió aumentar la producción de biomasa (4%) y la concentración de DHA (58%). Sin embargo, el aumento más importante se obtuvo cuando el medio de cultivo (RC-EL-GMS) fue suplementado con vitaminas B [tiamina, biotina y cobalamina (B<sub>12</sub>)]. La biotina es un cofactor para muchas enzimas carboxilasa esenciales (Streit et al. 2003), incluyendo la acetil coenzima A (CoA) carboxilasa, la cual participa en la síntesis de ácidos grasos. La tiamina es cofactor para un número de enzimas que participan en el metabolismo de carbohidratos primarios y de aminoácidos de cadena ramificada (Showern 1998). La cobalamina actúa como cofactor para las enzimas que catalizan las reacciones de

transposición-reducción o reacciones de transferencia de metilo. En algunas algas, la auxotrofía de cobalamina se debe al hecho de que sólo contienen una metionina sintasa dependiente de B<sub>12</sub> (MetH). El hecho de que algunas algas puedan crecer en ausencia de la vitamina, se explica ya que también contienen metionina sintasa independiente de B<sub>12</sub> (Croft et al. 2005).

La adición de vitaminas B al medio de cultivo RC, no sólo permitió aumentar el contenido de DHA en la biomasa (162%) sino que también se obtuvo un aumento en la concentración de biomasa (79%) en relación a los resultados obtenidos en la fermentación de RC como la única fuente de nutrientes. El aumento simultáneo en concentración de biomasa y contenido de DHA en los AGs produjo un incremento del 369% en la concentración de DHA. La productividad de DHA (540 mg/L/día) en el medio de cultivo optimizado basado en los residuos de la cepa nativa Thraustochytriidae sp. AS4-A1 es 10 veces superior al obtenido por las otras cepas nativas de traustoquitridos (C41 y M12-X1) y es comparable a las reportadas para *Schizohytrium* KH105 (0,6 g/L /día) y *Schizochytrium limacinum* SR21 (0,8 g/L/día)] en un medio de cultivo semi-optimizado (Aki et al. 2003; Yokochi et al. 1998).

La contribución relativa de los AG producidos por las cepas Thraustochytriidae sp. C41, M12-X1 y AS4-A1 es dependiente de la fuente de carbono y que tambien influye en la concentración de biomasa (Tablas 2.5, 2.6, 2.7). Las células (Thraustochytriidae sp C41 y AS4-A1) cultivadas en esas fuentes de carbón que permitieron la producción de concentraciones más altas de la biomasa (RC y almidón) contuvieron menos DHA y más intermediarios (C17: 0, C18: 1, C20: 2, y C20: 3); las celulas Thraustochytriidae sp M12-X1 cultivada en la fuente de carbono que permitió la producción de concentraciones más

altas de biomasa (RC) contiene menos DHA y mas intermediarios (C16:1, C18:0 y C20:3).

Lo opuesto fue encontrado para las células crecidas en RP1 y RP2 en los cuales se obtuvieron las más bajas concentraciones de biomasa. Estos resultados sugieren un control negativo en las reacciones finales en la síntesis de DHA cuando la actividad de la célula se aumenta a través de cambios en la fuente de carbono. Sin embargo, cuando la velocidad de crecimiento de AS4-A1 es aumentada en el medio RC a través del suplemento de nitrógeno y de vitamina-B, la contribución relativa de ARA+EPA y DHA aumentan, mientras que el ácido linolenico disminuye (Figura 2.7).

Estos resultados indican que algunos componentes en las fuentes de nitrógeno, y las vitaminas B aumentan la actividad de las enzimas que participan en las reacciones de conversión de los precursores de AG a AGs más insaturado. Así, bajo condiciones optimizadas podría obtenerse un perfil de AG como el registrado para la producción de DHA por *Ulkenia* sp. a escala industrial [C14:0 3%, C16:0 30%, C18:0 1%, C22:5(n-6) 11%, C22:6(n-3) 46%, (Kiy et al, 2005)].

La producción de ASX, el otro producto valioso sintetizado por la cepa AS4-A1, sigue un comportamiento diferente al de la producción de DHA debido a los cambios en la composición del medio del crecimiento basado en RC. La concentración más alta de ASX se alcanza hacia el final de la etapa de crecimiento. Este comportamiento sugiere que el pigmento es un metabolito secundario no esencial para el crecimiento cuya síntesis se podría ser desencadenada por el estrés debido al agotamiento de nutrientes. Esto sería corroborado por los resultados obtenidos en las fermentaciones de RC, RC-EL-GMS y RC-EL-GMS más vitaminas en las cuales como se produce más biomasa, el contenido de ASX en la biomasa disminuye. Por otro lado, existe una correlación lineal negativa ( $R^2=0.693$ )

entre el contenido de DHA y ASX en la biomasa cuando se modifica la relación C/N. Este comportamiento coincide con el descrito para la cepa *Schizochytrium* KH105, para la cual una baja concentración de nitrógeno favorece la producción de ASX. La mayor productividad de ASX ( $63 \pm 3$  mg/L/día) en 5-días de fermentación de RC puro por la cepa nativa es mucho mayor que las reportadas para fermentaciones de *Schizohytrium* KH105 (1,5 mg/L/día) en glucosa (10% p/v) con una concentración de nitrógeno muy baja (menos del 0,3%) (Aki et al. 2003) y *Haematococcus* pluvialis (1,9 mg/L/día) (Tjahjono et al. 1994). En la fermentación de glucosa con un residuo de destilería como fuente de nitrógeno por *Schizohytrium* KH105 la mayor concentración de ASX fue de 7,7 mg/L (Yamasaki et al. 2006) muy inferior a la obtenida en la fermentación de RC puro por la cepa AS4-A1 ( $229 \pm 15$  mg/L) después de 7 días. El contenido de ASX en la biomasa de la cepa AS4-A1 (3% p/p) es comparable a la reportada en *Haematococcus* pluvialis (3.0-3.5%) la principal fuente comercial de ASX (Olaizola 2000). Debido a que los traustoquitridos son microorganismos heterotróficos su uso en la producción de ASX a escala industrial ofrecerían ventajas por sobre microorganismos fototrópicos como *Haematococcus*.

## 2.6 Conclusiones

Las cepas nativas de trautoquitridios son capaces de producir biomasa y lípidos con diferentes perfiles de AG con contenido de DHA cuando son cultivados en medios formulados con residuos líquidos de la industria alimentaria, encontrándose que el mayor potencial para la producción de DHA por las cepas nativas es el subproducto del proceso de la cerveza (RC).

El subproducto del proceso de la cerveza es un excelente fuente de nutrientes para la producción de DHA y ASX por la cepa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1.

La cepa nativa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 presenta contenido similar de ASX en la biomasa a *Haematococcus pluvialis*, la principal fuente comercial de ASX.

En las evaluaciones de parámetros físico-químicos y nutrientes la cepa nativa *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 presenta una productividad de DHA comparable y una concentración de ASX superior que la cepa *Schizochytrium KH105* del hemisferio norte, la cual ha sido considerada una fuente promisoria de DHA y ASX.

La relación C/N influye en el contenido de DHA y ASX en la biomasa de la cepa AS4-A1, baja concentración de nitrógeno favorece la presencia de ASX, contrario a lo que ocurre con el contenido de DHA, lo cual es importante para formular el medio de cultivo de acuerdo a la molécula de interés.

Se concluye además, que adicionando vitaminas al medio de cultivo se potencia la acción de los traustoquitridios para la producción de DHA.

### **3. Bibliografia**

Aki T, Hachida K, Yoshinaga M, Katai Y, Yamasaki T, Kawamoto S, Kakizono T, Maoka T, Shigeta S, Suzuki O, Ono K (2003). Thraustochytrids as a potential source of carotenoids. *J Am Oil Chem Soc* **80**: 789-794.

Allen, E. E. & Bartlett, D. H. (2002) Structure and regulation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase genes from the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* ssp. strain S59. *Microbiology*, **148**: 1903-1913.

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

American Public Health Association. (1992). Standards Methods for the examination of water and wastewater. 19 th. APHA.

An GH, Bielich J, Auerbach R, Johnson EA (1991). Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnology* **9**: 70-73.

AOAC (1995) Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International, 16th Ed., Assoc. of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

Armenta R E, Burja A, Radianingtyas H, Barrow C J (2006). Critical assessment of various techniques for the extraction of carotenoids and co-enzyme Q10 from the thraustochytrid strain ONC-T18 J. Agric. Food Chem **54**: 9752-9758.

Bajpai PK, Bajpai P, Ward OP (1991a). Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. J Am Oil Chem Soc **68**: 509-14.

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

Bremer G (2000). Isolation and culture of Thraustochytrids. In: Hyde K, Pointing S (eds) Marine mycology — a practical approach. Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp 49-61.

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, G., Pignataro, L. & Santangelo, G. (2004) Thraustochytrids (fungoid protists): an unexplored component of marine sediment microbiota. *Sci. Mar.* **68**: 43-48.

Borowitzka, M. A., (1995) Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. Journal of Applied Phycology, 7, 3-15.Volkman, J. K., (2003) Sterols in microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol, **60**: 495-506.

Bhosale, P. (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, **63**: 351-361.

Bowles R.D., Hunt, A.T., Bremer, G.B., Dchars, M.G. & Eaton, R.A. (1999) Long -chain n – 3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimization of docosahexaenoic acid production. *J. Biotechnol.* **70**: 193–202.

Bowles R.D., Hunt, A.T., Bremer, G.B., Dchars, M.G. & Eaton, R.A. (1999) Long -chain n – 3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimization of docosahexaenoic acid production. *J. Biotechnol.* **70**: 193–202.

Burja AM, Radianingtyas H (2005). Marine microbial-derived nutraceutical biotechnology: an update. *Food Sci Technol* **19**:14-16.

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. *App 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. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 884-888.

Cavalier-Smith, T. (1997). Sagenista and Bigyra, two phyla of heterotrophic heterokont chromists. *Arch. Protistenkd.* **148**: 253-267.

Cavalier-Smith, T., M. T. E. P. Allsopp, and E. E. Chao. (1994). Thraustochytrids are chromists, not fungi: 18S r RNA signature of Heterokonta. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 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.

Chisti Y (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotech Adv* **25**: 294-306.

Connor W E, Neuringer M., and Reisbick S (1992). Essential fatty acids: the importance of n-3 fatty acids in the retina and brain. *Nutr. Rev* **50**: 21-29.

Croft, M. T., A. D. Lawrence, E. Raux-Deery, M. Warren, and A. G. Smith. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **48**: 90–93.

Dewick, P. M. Medicinal Natural Products, John Wiley & Sons. Ltd., 2002, p 35, 40, 60.

Dufosse, L., Galaup P., Yaron A., Arad S. M., Blanc P., Murthy K. M., Ravishankar G. A. (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology* **16**: 389-406.

Edge, R., McGarvey, D. J., Truscott, TG., (1997) The carotenoids as antioxidants -a review. *J Photochem Photobiol B: Biology*, **41**: 189-200.

Fakas S, Certik M, Papanikolaou S, Aggelis G, Komaitis M, Galiotou-Panayotou M (2007). Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technol* **40**: 1321-1327.

Fan KW, Chen F, Jones EB, Vrijmoed LL. 2001. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**(4):199-202.

Fan, K.W., Vrjimoed, L.L.P. & Jones, E.B.G. (2002) Physiological studies of subtropical mangrove thraustochytrids. *Bot. Mar.* **45**, 50–57.

FAO Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations,  
Rome

Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., de la Torre-Boronat, M.C., López-Sabater, M.C. (2001). Rapid high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in human plasma and low-density lipoproteins, *Journal of Chromatography B* 758, pp. 315–322.

Goldstein S (1963) Development and nutrition of new species of *Thraustochytrium*. *Am J Bot* **50**: 271-279.

Guerin M, Huntley M E, and Olaizola M (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* **21**: 210-216.

Hasegawa, M.; Kishino, H.; Yano, T.A.: Dating the human–ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, **22**: 160-174; 1985.

Hinzpeter I (2008) Identification of microorganisms of Thraustochytriales order from the coastal zone in Puerto Montt, Chile, and determination of their potential for the production of docosahexaenoic acid. Doctoral thesis at Natural Resource Science Doctorate Program. Universidad de La Frontera

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.Honda, et al.,1998

Honda, D., Yokochi, T. Nakahara T., Raghukumar, S., Nakagiri, A., Schaumann, K. & Higashihara, T. (1999) Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. J. Eukaryot. Microbial. 46, 637-647.

Horrocks L A and Yeo Y K (1999) Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). Pharmacol. Res 40: 211-225.

Huang, J., Aki, T., Hachida, K., Yocochi, T., Kawamoto, S., Shigeta, K. Ono, K. & Suzuki, O. (2001) Profile of polyunsaturated fatty acids produced by Thraustochytrium sp KK17-3. J. Am oil Chem Soc, 78, 605-610.Huang, et al, 2001

Huang J, Aki T, Yocochi 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 5:450-57.

Iida, I., Nakahara, T., Yokochi, T., Kamisaka, Y., Yagi, H., Yamaoka, M. & Suzuki, O. (1996) Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of Thraustochytrium aureum by medium optimization. J Fermentation and Bioengineering, 81, 76-78.

Jiang, Y., Fan, K. W. Wong, R.TY. & Chen, F. (2004) Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schyzochytrium mangrovei*. J. Agric. Food Chem., **52**, 1196-1200.

Kamlangdee N, Fan KW (2003) Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. J Sci Technol **25**: 643-650.

Kimura H, Fukuba T, Naganuma T. (1999). Biomass of Thraustochytrids protocists 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.

Kiy T, Rusing M, Fabritius D (2005) Production of docosahexahenoic acid (DHA) by the marine microalga, *Ulkenia* sp, In: Z. Cohen, C. Ratledge (Eds.), Single Cell Oils, American Oil Chemists Society, Champaign, IL, USA

Kuratko, CN., Salem, N. 2009. Biomarkers of DHA status . Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **81**: 111-118.

Leander, C. A., and D. Porter. 2000. Redefining the genus *Aplanochytrium* (phylum Labyrinthulomycota). Mycotorax **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, T.E., Nichols, P.D. & McMeekin, T.A. (2000) Production of polyunsaturated fatty acids by Australian thraustochytrids: aquaculture applications in hatchery feeds: Proceedings of a workshop held in Cairns, 9-10 March 2000

Lewis TE, Nichols PD, McMeekin TA (2000) Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. J Microbiol Methods **43**: 107-16.

Lewis, T. E.; Nichols, P. D.; McMeekin, T. A. (2001). Sterol and squalene content of a docosahexaenoic-acid-producing thraustochytrid: influence of culture age, temperature, and dissolved oxygen. Mar. Biotechnol., **3**: 439–447.

Li Q, Chen GQ, Fan KW, Lu FP, Aki T, Jiang Y (2009) Screening and Characterization of Squalene-Producing Thraustochytrids from Hong Kong Mangroves. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 4297-4272

Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang FS, Teter B, Ubeda O, Salem N, Frautschy SA, Cole GM (2005) A diet rich with omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci* **25**: 3032-40.

Lu, HT., Jiang, Y. & Chen, F. (2003) Preparative separation and purification of squalene from the microalga *Thraustochytrium* ATCC 26185 by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatography A* **994**: 37-43.

Lutria, D. L., Mohammed, B. S. & Sprecher, H. (1996) Regulation of biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**, 16020-16025.

Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* **34**: 1-5.

Miao X and Wu Q (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* **97**: 841-846.

Morris DL. (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* **107**: 254-5.

Naganuma, T., Takasugi, H. & Kimura, H. (1998) Abundante of thraustochytrids in costal plankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **162**, 105-110.

Olaizola M (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25000-liter outdoor photobioreactors. *J Appl Phycol* **12**: 499-506.

Porter, D. 1989. Phylum Labyrinthulomycota, In L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, and D. Chapman (ed.), *Handbook of protocista*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, Mass p. 388-398.

Porter, D. (1990) Phylum Labyrinthulomycota. In: Margulis, L., Corliss, JO., MelKonian, M., Chapman, D., (eds) Hanbook of Protoctista. Jones & Bartlett, Boston. p. 388 -398.

Qiu, X. (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA,22:6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways. prostaglandins, leukotriens and essencial fatty acids. **68**, 181-186.

Quilodran B, Hinzpeter I, Quiroz A, Shene C (2009) Evaluation of liquid residues from beer and potato processing for the production of docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) by native thraustochytrid strains. *World J Microbiol and Biotechnol* **25**: 2121-2128

Quilodran B, Hinzpeter, Hormazabal E, Quiroz A, Shene C (2010) Docosahexaenoic acid (C22: 6n-3, DHA) and astaxanthin production by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 a native strain with high similitude to *Ulkenia* sp.: evaluation of liquid residues from food industry as nutrient sources. Enzyme and Microbial Technol doi:10.1016/j.enzmictec.2010.04.002

Raghukumar, S. (1979) Observations of the life cycle and movement of the thraustochytrids *Ulkenia amoeboides* (Bahnweg & Sparrow) from the North Sea. *J. Protozool.* **26**, 564-566.

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

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

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

Raghukumar, S. & Raghukumar C.(1999) Traustochytrid fungoid protists in faecal pellets of the tunicate *Pegea confoederata*, their tolerance to deep-sea conditions and implication in degradation processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **190**: 133-140.

Raghukumar, S. Anil, A.C., Khandeparker & Pati, J.S. (2000) Thraustochytrid protists as a component of marine microbial films. *Mar. Biol.* **136**: 603-609.

Raghukumar, S. Ramaiah, N., & Raghukumar, C. (2001) Dynamics of thraustochytrid protists in the water column of the Arabian Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **24**: 175-186.

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

Raikar, M.T., Raghukumar, S., Vani, V., David, J.J. & Chandramohan, D. (2001) Thraustochytrid protists degrade hydrocarbons. *Ind. J. Mar. Sc.* **30**, 139-145.

Rao, C. V.; Newmark, H. L.; Reddy, B. S. (1998). Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, **19**: 287-290.

Ratledge, C. (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*. **86**, 807-815.

Sargent JR, Henderson RJ, Tocher DR (1989) The lipids. In: Fish nutrition. Academic, NY.

Santangelo, G., Bongiorni L. & Pignataro L. (2000) Abundance of thraustochytrids and ciliated protozoans in a Mediterranean sandy shore determined by an improved, direct method. *Aquat. Microb. Ecol.* **23**, 55-61.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sayanova, O. V. & Napier, J. A. (2004) Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochemistry*. **65**, 147-158.

Schowen, R. 1998. Thiamine-dependent enzymes, p. 217-266. In M. Sinnott (ed.), Comprehensive biological catalysis, vol. 2. Academic Press, San Diego, Calif.

Sijtsma L, De Swaaf Me (2004) Biotechnological production and applications off the ω-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied Microbiol Biotechnol* **64**:146-153

Singh A, Wilson S, Ward OP (1996) Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC20892. *J Microbiol Biotechnol* **12**: 76-83

Singh A, Ward OP (1997a) Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC28210. *J Ind Microbiol* **16**: 370-373

Skulberg, O. M.,(2000) Microalgae as a source of bioactive molecules-experience from cyanophyte research. *J. Applied Phycology*, **12**: 341-348

Somashekar D, Joseph R (2000) Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ration of the growth medium. *World J Microbiol Biotechnol* **16**: 491-493.

Stevens L, Zhang W, Peck L, Kuczak T, Grevstad N, Mahon A, Zentall SS, Arnold LE, Burgess JR (2003). EFA supplementation in children with inattention, hyperactivity, and other disruptive behaviors. *Lipids* **38**: 1007-1021.

Streit, W. R., P. Entcheva. (2003). Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 21-31.

Swofford, D.L.: PAUP\* (2000). Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods); Version 4. Sinauer Associates; Sunderland; MA;

Tanaka, S., Yaguchi, T., Shimizu, S., Sogo, T., Fujikawa, S. (1999). Process for preparing docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid with *Ulkenia* United States Patent 6509178.

Tjahjono, A. E., Kakizono, T., Hayama, Y., Nishio, N., Nagai, S. (1994). Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis* and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **77**: 352-357.

Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S, Hayashi M (2009) Extracellular enzymes produced by marine eukaryotes, thraustochytrids. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 180-182.

Uauy R, Hoffmann DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE (2001). Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* **36**, 885-95.

Unagul P, Assantachai C, Phadungruengluj S, Suphantharika M, Tanticharoen M, Verduyn C (2007). Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic (C22:6n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. *Bioresource Technol* **98**, 281-7.

Volkman, J.K. (2003) Sterols in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 495-506.

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

Weete, J.D., Kim, H., Gandhi, S.R., Wang, Y. & Dute, R. (1997) Lipids and ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185. *Lipids* **32**, 839-845.

Wen, Z-Y & Chen, F. (2003) Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*. **21**, 273-294.

Wu, S. T., Yu, S. T. & Lin, L. P. (2005) Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. *Process Biochemistry*, **40**: 3103-3108.

Yamane Y, Higashida K, Nishio N (1997) Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-bath cultures. Kinetic and stoichiometric analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4471-4478.

Yaguchi T, Tanaka S, Yokochi T, Nakahara T, Higashihara T (1997) Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *J Amer Oil Chem Soc* **74**: 1431-4.

Yamasaki T, Aki T, Shinozaki M, Taguchi M, Kawamoto S, Ono K (2006) Utilization of shochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using thraustochytrid. *J Biosci Bioeng* **102**,323-7.

Yokochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T (1998) Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**,72-6.

Yokohama R, and Honda D (2007) Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sesu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes, stramenopiles): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* **48**, 199-211.

Yue C-J, Jiang Y, Impact of Methyl Jasmonate on Squalene Biosynthesis in microalga  
*Schizochytrium mangrovei*, *Process Biochemistry* (2008), doi:10.1016/j.procbio.2009.03.0

#### **4. Anexo**

## Evaluation of liquid residues from beer and potato processing for the production of docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) by native thraustochytrid strains

B. Quilodrán · I. Hinzpeter · A. Quiroz ·  
C. Shene

Received: 27 February 2009 / Accepted: 6 July 2009 / Published online: 17 July 2009  
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

**Abstract** Liquid residues from beer (RB) and potato (RP) processing were evaluated as carbon sources for the production of docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) by two native Thraustochytriidae sp., M12-X1 and C41, in shaking flask experiments. Results were compared with those obtained in the fermentations of glucose, maltose, soluble starch and ethanol. Both strains produced the highest biomass concentration (2.3 g/L) in the fermentation of RB supplemented with nitrogen sources [yeast extract (YE) and monosodium glutamate (MSG)]. DHA content in the fatty acids produced by the native thraustochytrids was dependent on the fermented carbon source; the fatty acids from biomass grown on carbon sources that permitted a lower growth rate contained more DHA. The highest DHA productivity [55.1 mg/(day L)] was obtained in the fermentation of RB-YE-MSG by M12-X1 strain. In this medium, M12-X1 strain grew at a specific growth rate of 0.014 h<sup>-1</sup> and total fatty acid content in the biomass was 41.3%. Production of DHA by M12-X1 strain followed a

non-growth rate associated pattern and DHA content in the biomass decreased significantly after growth ceased.

**Keywords** Thraustochytrids · Polyunsaturated fatty acid · DHA · Wastewater

### Introduction

Many positive physiological effects of long chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in human beings and animals have been described (Uauy et al. 2001). Particularly, docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) has been suggested as a dietary supplement to prevent the onset of degenerative disorders such as Alzheimer's disease (Lim et al. 2005) and for the treatment of attention deficit syndrome in children (Stevens et al. 2003). In aquaculture operations, dietary long chain PUFAs are essential components; several marine species require diets containing between 1 and 2% w/w (Rees et al. 1994; Salhi et al. 1994). It has been shown that fish diets with a high ratio DHA/EPA enhance size and vitality of visual predators (Copeman et al. 2002).

The main source of long chain PUFAs is fish oil that until 1990 was consumed by the fish feed manufacturing sector in less than 10% of global production. In recent years, this scenario has changed and some authors predict that future consumption of fish oil by this sector will exceed 80% of global supplies (Tacon et al. 2006). Since annual fish oil production has not increased beyond 1.5 million tons per year (Turchini et al. 2009) in the past 25 years, sustainable PUFA sources must be identified. It has been shown that some strains of the Thraustochytriidae family accumulate more than 50% of their dry weight as lipids in which DHA represents more than 25% (Bajpai

B. Quilodrán  
Department of Natural Resources and Environment, Universidad de Los Lagos, Casilla 557, Puerto Montt, Chile

I. Hinzpeter  
Department of Government and Management, Universidad de Los Lagos, Casilla 557, Puerto Montt, Chile

A. Quiroz  
Department of Chemical Sciences, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile

C. Shene (✉)  
Department of Chemical Engineering and Agri Aquaculture Nutritional Genomic Center, Technology and Process Unit, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile  
e-mail: cshene@ufro.cl

et al. 1991a, b; Yaguchi et al. 1997; Yokochi et al. 1998). PUFAs provide important properties to the cell membranes of marine microorganisms enabling them to survive in low temperature—high pressure environments. In thraustochytrids, a small fraction of the lipids (less than 5%) is found in the phospholipid fraction; most of their lipids are accumulated as triacylglycerols (70–98%) constituting energy reserves (Yaguchi et al. 1997). Furthermore, oil content of many types of microalgae and marine protists, greatly exceeds the oil productivity of the best producing oil crop, and so, these sources are potentially more attractive for biodiesel production than traditional terrestrial plants (Chisti 2007; Miao and Wu 2006; Meng et al. 2009).

For the commercial exploitation of a microbial oil source, a cost-effective production system has to be defined. In the fermentation stage costs are mainly due to nutrients, thus in recent years the interest for converting residues and by-products of the food industry into added-value products such as DHA has been promoted (Fan et al. 2001; Unagul et al. 2007; Yamasaki et al. 2006). Residues from beer and potato processing could be used as nutrient sources for the production of microbial biomass and product synthesis. In Chile, beer consumption has increased from 27.5 L per capita in 2004 to 34.4 L in 2007, with a production of 5,673,000 hL in 2007; on average, 27 kg of solid residues (bagaze) are generated per one hL of beer. Chile is the sixth potato producer in Latin America (1.5 million ton in 2006) and 10% of the production is processed.

In a previous work, two native thraustochytrid strains were isolated (Hinzpeter 2008). These strains drew our attention because they produce fatty acids with a high proportion of DHA (between 35 and 50%) when cultivated in a basal growth medium. The aim of the present work was to examine the potential of liquid residues from potato processing and beer production as carbon sources for the production of DHA by our native strains. Productivity of these fermentations was compared to those obtained in the fermentation of pure carbon sources (glucose, maltose, soluble starch and ethanol). The effect of the carbon source on the fatty acids produced by the native strains was determined. Production of biomass, DHA and total fatty acids (TFAs) during the fermentation of the best carbon source by M12-X1 strain was followed as a function of time.

## Materials and methods

**Chemicals.** Monosodium glutamate (MSG), glucose, ethanol, methanol, NaOH, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, dichromate

were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Peptone, yeast extract (YE) were obtained from Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England). Agar was obtained from Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA. Streptomycin sulphate and penicillin G were obtained from Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany). FAME standards (Mix L209, FAME C20:0, C20:1, C20:4, C22:1, C22:6) was obtained from Alltech (USA). Composition of artificial sea water (ASW) was for 1 L: NaCl 27.50 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5.38 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6.78 g, KCl 0.72 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.20 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.40 g.

**Residues.** Two of the liquid residues evaluated were obtained from potato chips processing; RP1 corresponds to the bleaching water and RP2 is water from the initial cold wash. The beer residue (RB) was obtained from bagaze filtration. The residues were filtered with cheesecloth and then by using paper filter (Advantec, No. 1, 1 µm).

**Microorganisms.** Two native Thraustochytriidae sp. strains, M12-X1 (GenBank accession number DQ459552), and C41 (GenBank accession number DQ459550), isolated from Chinquihue coast zone at Puerto Montt, Chile were used (Hinzpeter 2008). M12-X1 and C41 strains were identified and classified as members of *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* genera, respectively. The strains were kept at 4°C in B1 solid medium (for 1 L of ASW: peptone 1 g, YE 1 g, agar 10 g; pH 6.5) containing streptomycin sulphate and penicillin G (300 mg/L); cells were seeded monthly.

**Culture conditions.** The inoculum was prepared transferring cells from B1 agar plates to 50 mL of sterile B2 medium (for 1 L ASW: glucose, 20 g, YE, 2 g, MSG, 2 g). Incubation was carried out for 48 h at 25°C in shaking flasks (180 rpm). The residue based media contained YE (2 g/L) or YE-MSG (both at 2 g/L) and the salts in ASW (Hinzpeter 2008). Before sterilization (121°C, 15 min) pH of the medium was fixed (NaOH or HCl) at 6.5, unless specified. Sterile growth medium (100 mL) was inoculated (5% v/v, absorbance of inoculum 0.6 at 600 nm) and incubated at 25°C in shaking flasks, for 72 h. Fermentations of glucose (20 g/L), maltose (20 g/L), starch (20 g/L) and ethanol (2 g/L) all containing YE-MSG and fermentation of YE-MSG were carried out. Results are presented as mean ± SD of triplicate assays. Data for the growth curve of M12-X1 strain was obtained from shaking flasks of 250 mL containing 100 mL of RB-YE-MSG medium incubated at 25°C. Two flasks were taken out every 24 h for analysis. Results are presented as mean ± SD of duplicate assays.

## Analytical methods

**Biomass production and residual total carbohydrate content.** Total biomass was recovered by centrifuging

( $4,000 \times g$ , 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) washed three times with sterile distilled water, frozen, lyophilized and its weight gravimetrically determined. Residual total carbohydrate content was determined using the anthrone method (Morris 1948).

**Proximate analysis.** Proximate composition of solids in the liquid residues was determined according to AOAC methods (AOAC 1995). Water was evaporated at  $65^{\circ}\text{C}$ . Protein content was determined by measuring nitrogen ( $\text{N} \times 6.25$ ) by Kjeldhal method; crude ash was determined following combustion at  $550^{\circ}\text{C}$  for 6 h. Fat was assayed by ether extraction using the Soxhlet method. Nitrogen-free extract (NFE) was determined from the difference between dry weight of the sample and the contents of ash, protein and fat.

**Chemical oxygen demand (COD).** COD was determined according to the Chilean Norm (NCh2313/24.Of97). Briefly, organic matter was oxidized by dichromate in sulphuric acid media at  $150^{\circ}\text{C}$  for 2 h in COD tubes. After allowing the COD tubes to cool down to room temperature, COD levels were determined by measuring the absorbance of the digested assay solution at 600 nm. A 1 cm path length was maintained by using either a standard cuvette (2.5 mL sample size) or semi-micro cuvette (1.0 mL sample size).

**Trace elements.** Liquid residue samples were analyzed for dissolved concentrations of Mn, Mg, Fe and Cu in a flame atomic absorption spectrometer (FAAS; Perkin Elmer, model ANALYSYST 200), with double beam and automatic background corrections, and using hollow cathode lamps (Mito Riko, Japan) for respective metallic elements. Air-acetylene was used as fuel. FAAS determinations were carried out according to instrumental operating conditions as recommended by the manufacturer.

**Elemental analysis.** Samples (0.5–2.0 mg) of lyophilized biomass were analyzed in elemental analyzer (Euro Vector Instrument model Euro EA and software).

**Fatty acid analysis.** Samples of lyophilized biomass (20–50 mg) were used for direct transesterification (Lewis et al. 2000). The fatty acid methyl esters (FAMEs) in the hexane layer were collected by centrifuging at  $4^{\circ}\text{C}$ . The resulting FAMEs were analyzed by GC (FOCUS-Finnigan)/MS (DSQ-Finnigan), equipped with HP Ultra 1 capillary column (30 m long and 0.25 mm inner diameter). Column temperature was programmed from  $40\text{--}300^{\circ}\text{C}$  with a rate increase of  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . A flame ionization detector with helium as a carrier gas ( $200^{\circ}\text{C}$ ) was used. The injector was kept at  $250^{\circ}\text{C}$ . Injection volume was 1  $\mu\text{L}$ . The FAMEs' peaks were identified and quantified using fatty acid standards.

**Statistics and calculations.** One-way ANOVA test followed by Tukey multiple comparison tests were used to analyze data. Significance of the effects was determined at 0.05 confidence level. Results are presented as mean  $\pm$  SD

from replicate assays. Specific growth rate was calculated by determining the slope of the straight-line portion of exponential growth on a semilog plot. The yield coefficients for biomass and DHA production on substrates were calculated from the mass ratio between synthesized product and consumed substrate.

## Results

Composition of soluble solids in the liquid residues is presented in Table 1. Concentrations of crude protein and NFE of the liquid residues RP1, RP2 and RB were 1.8, 0.5 and 2.5 g/L, and 13.0, 0.8 and 27.4 g/L, respectively. Carbon to nitrogen ratio in RP1, RP2 and RB were 173, 178 and 42, respectively. Among the three residues, RB contained more Mn (0.184 mg/L) whereas RP2 contained more Mg (264 mg/L). COD of RP1, RP2 and RB were 6,020; 9,820 and 34,900 mg/L, respectively.

### Heterotrophic growth of thraustochytriidae C41 and M12-X1

Thraustochyrid strains were cultivated in six growth media in which the residues were used as C source. Two different nitrogen supplementations were evaluated yeast extract (YE) and yeast extract plus monosodium glutamate (YE-MSG). Fermentations of pure C sources [glucose (Glu), maltose (Malt), soluble starch (Star) and ethanol (Eth)] and

**Table 1** Proximate, elemental and chemical analysis of the liquid residues used for the growth of the native thraustochyrid strains

	RP1	RP2	RB
Solids (%) <sup>a</sup>	0.42	0.17	3.22
Ash (%) <sup>b</sup>	23.8	17.6	5.9
Proteins (%) <sup>b</sup>	42.8	29.4	7.8
Fat (%) <sup>b</sup>	4.8	5.9	1.2
NFE (%) <sup>b</sup>	30.9	52.9	85.1
N (%) <sup>b</sup>	0.36	0.23	1.2
C (%) <sup>b</sup>	61.95	41.61	50.44
H (%) <sup>b</sup>	32.06	6.47	24.74
Mg (mg/L)	73	264	0.095
Mn (mg/L)	<0.08	0.094	0.184
Fe (mg/L)	<0.440	1.055	<0.440
Cu (mg/L)	0.131	0.364	0.361

RP1 (bleaching water) and RP2 (initial cold wash) are liquid residues from potato processing, and RB (bagaze filtration) is the residue from beer production

<sup>a</sup> In the liquid, <sup>b</sup>in the soluble solids

the nitrogen source mix (YE-MSG) were carried out as control experiments.

Tables 2 and 3 show the biomass concentration, DHA content in the biomass and DHA productivity of the different fermentations carried out by M12-X1 and C41 strains, respectively. Growth medium composition had a significant ( $P < 0.05$ ) effect on biomass production by both native strains. The highest biomass concentration (2.3 g/L) of C41 strain was obtained in the fermentations of RB-YE-MSG and Star-YE-MSG. Biomass concentration was 360% higher than that obtained in the fermentation of the nitrogen source mix (YE-MSG). The same biomass concentration was obtained in the fermentation of RB-YE-MSG by M12-X1 strain.

DHA content in the biomass of both thraustochytrid strains was significantly ( $P < 0.05$ ) affected by growth medium composition. The higher DHA contents in the biomass of C41 (40.3 mg/g) and M12-X1 (120.2 mg/g) were obtained in the fermentations of Eth-MSG-YE and MSG-YE, respectively. Besides fermentation of residues supplemented with the nitrogen source mix by both strains, allowed to produce biomass with higher DHA contents compared with the values obtained fermentations in which YE was the only nitrogen source.

DHA productivity in the native strain fermentations was significantly ( $P < 0.05$ ) affected by the composition of the growth medium. Fermentation of RB-YE-MSG by M12-X1 exhibited the highest DHA productivity [55.1 mg/(day L)]. Compared to this, the fermentations of C41 strain

**Table 2** Biomass concentration, DHA content in the biomass and DHA productivity ( $P_{DHA}$ ) of the fermentations of liquid residues (RP1, RP2 and RB) based media, pure C sources [glucose (Glu) 20 g/L, maltose (Malt) 20 g/L, soluble starch (Star) 20 g/L and ethanol (Eth), 2 g/L] and nitrogen source mix (CM) by Thraustochytriidae sp. C41

Medium	Biomass (g/L)	DHA (mg/g)	$P_{DHA}$ [mg/(day L)]
RP1-YE	0.4 ± 0.02 <sup>c,d</sup>	14.9 ± 2.5 <sup>b,c</sup>	2.0 ± 0.3 <sup>b</sup>
RP2-YE	0.3 ± 0.03 <sup>d</sup>	ND	ND
RB-YE	0.7 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>
RP1-YE-MSG	1.2 ± 0.20 <sup>b</sup>	36.7 ± 5.8 <sup>a</sup>	14.7 ± 4.8 <sup>a</sup>
RP2-YE-MSG	1.3 ± 0.10 <sup>b</sup>	35.0 ± 11.4 <sup>a</sup>	15.6 ± 5.3 <sup>a</sup>
RB-YE-MSG	2.3 ± 0.40 <sup>a</sup>	15.3 ± 2.3 <sup>b,c</sup>	11.4 ± 1.6 <sup>a</sup>
Glu-YE-MSG	0.3 ± 0.02 <sup>d</sup>	10.1 ± 3.3 <sup>b,c</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>b</sup>
Malt-YE-MSG	0.7 ± 0.06 <sup>c</sup>	8.3 ± 1.9 <sup>b,c</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>b</sup>
Star-YE-MSG	2.3 ± 0.36 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.3 <sup>b,c</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>b</sup>
Eth-YE-MSG	0.3 ± 0.01 <sup>d</sup>	40.3 ± 4.0 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.3 <sup>b</sup>
CM <sup>a</sup>	0.5 ± 0.10 <sup>c,d</sup>	17.6 ± 2.6 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.4 <sup>b</sup>

ND not determined because of the small biomass produced

<sup>a</sup> Contains YE and MSG

Within a column, means without a common superscript letter differ significantly ( $P < 0.05$ )

**Table 3** Biomass concentration, DHA content in the biomass and DHA productivity ( $P_{DHA}$ ) of the fermentations of liquid residues (RP1, RP2 and RB) based media, pure C sources [glucose (Glu) 20 g/L, maltose (Malt) 20 g/L, soluble starch (Star) 20 g/L and ethanol (Eth), 2 g/L] and nitrogen source mix (CM) by Thraustochytriidae sp. M12-X1

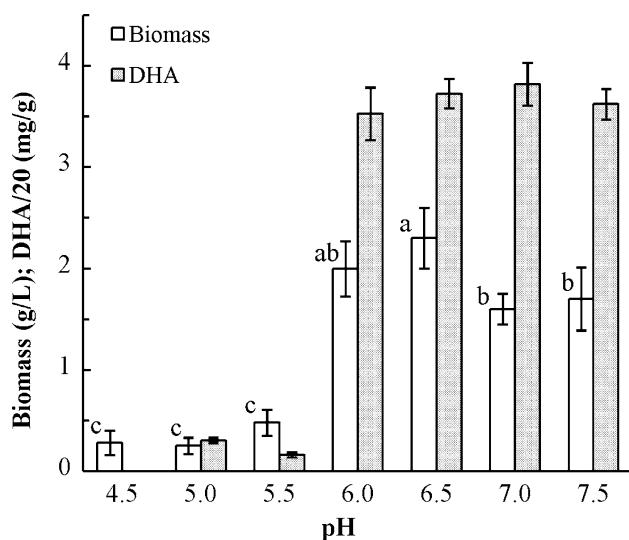
Medium	Biomass (g/L)	DHA (mg/g)	$P_{DHA}$ [mg/(day L)]
RP1-YE	0.6 ± 0.02 <sup>d</sup>	25.3 ± 0.3 <sup>d,e</sup>	5.4 ± 0.0 <sup>e</sup>
RP2-YE	0.6 ± 0.02 <sup>d</sup>	29.8 ± 2.7 <sup>d</sup>	6.2 ± 0.6 <sup>e</sup>
RB-YE	1.7 ± 0.10 <sup>b</sup>	16.0 ± 3.2 <sup>d,e</sup>	9.3 ± 2.2 <sup>d,e</sup>
RP1-YE-MSG	1.0 ± 0.05 <sup>c</sup>	73.0 ± 11.0 <sup>b,c</sup>	25.2 ± 3.7 <sup>b,c</sup>
RP2-YE-MSG	1.0 ± 0.20 <sup>c</sup>	58.0 ± 0.5 <sup>c</sup>	18.5 ± 2.8 <sup>c,d</sup>
RB-YE-MSG	2.3 ± 0.30 <sup>a</sup>	72.5 ± 2.9 <sup>b,c</sup>	55.1 ± 6.7
Glu-YE-MSG	1.1 ± 0.06 <sup>c</sup>	102.8 ± 9.7 <sup>a,b</sup>	38.7 ± 4.8 <sup>a</sup>
Malt-YE-MSG	1.0 ± 0.07 <sup>c</sup>	97.6 ± 9.7 <sup>b</sup>	32.7 ± 4.8 <sup>a,b</sup>
Starch-YE-MSG	1.1 ± 0.08 <sup>c</sup>	9.8 ± 1.5 <sup>e</sup>	3.7 ± 0.4 <sup>e</sup>
Eth-YE-MSG	0.8 ± 0.10 <sup>c,d</sup>	100.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	26.8 ± 2.4 <sup>b,c</sup>
CM <sup>a</sup>	0.5 ± 0.02 <sup>d</sup>	120.2 ± 18.1 <sup>a</sup>	20.4 ± 2.6 <sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Contains YE and MSG

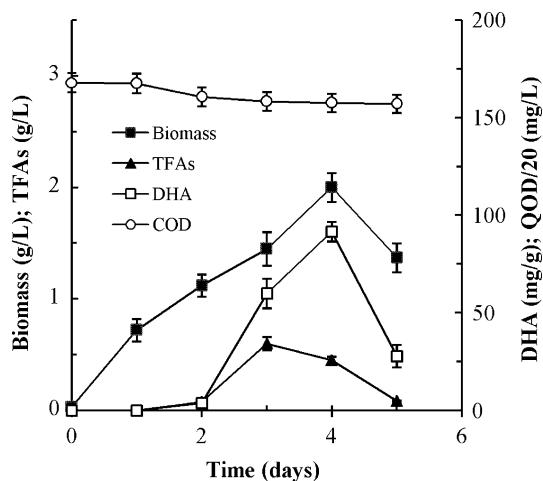
Within a column, means without a common superscript letter differ significantly ( $P < 0.05$ )

showed lower DHA productivities; the highest DHA productivity [15.6 mg/(day L)] was that of RP2-YE-MSG fermentation.

Fermentation of RB-YE-MSG by M12-X1 strain was chosen as the best system for the production of DHA. The effect of initial pH of RB-YE-MSG medium on the biomass and DHA production by M12-X1 strain is presented in Fig. 1. A very small biomass concentration (<0.5 g/L) was obtained when the initial pH of the medium was lower than 5.5. On the other hand, the differences in biomass concentration and DHA content in the biomass (70–76 mg/g) in fermentations carried out with initial pH of 6.0 and 6.5 were not significant ( $P > 0.05$ ). Changes in biomass concentration and the contents of DHA and TFAs in the biomass were followed during the fermentation of RB-YE-MSG medium by M12-X1 strain (Fig. 2). The highest TFAs content (41.3%) in the biomass was reached after 3 days. Biomass concentration (2.3 g/L) and its DHA content (91.6 mg/g) reached their highest values after 4 days. At this time COD decreased from 34,900 to 31,517 mg/L. Yield coefficients for biomass production on COD ( $Y_{\text{Biomass/COD}}$ ) and for DHA production on COD ( $Y_{\text{DHA/COD}}$ ) were 0.559 and 0.054 g/g, respectively. During this period, the total carbohydrate (TCH) content decreased from 25.3 to 10.9 g/L; thus yield coefficients for biomass production on TCH ( $Y_{\text{biomass/TCH}}$ ) and for DHA production on TCH ( $Y_{\text{DHA/TCH}}$ ) were 0.14 and 0.0127 g/g, respectively. The specific growth rate of M12-X1 strain in RB medium was 0.014 h<sup>-1</sup>.



**Fig. 1** Effect of initial pH of the RB-YE-MSG medium on biomass concentration and DHA content in the biomass of M12-X1 strain



**Fig. 2** Profiles of biomass concentration, contents of total FA (TFA) and DHA in the biomass of M12-X1 strain, and COD during the fermentation of RB-YE-MSG medium. Initial pH 6.5; temperature 25°C

Experiments were carried out to test the effect of RB concentration on DHA productivity of M12-X1 fermentations; in these fermentations RB was the only source of carbon and nitrogen. Results in Table 4 show that as RB concentration decreased, biomass concentration fell linearly ( $R^2 = 0.988$ ). In the fermentation of RB at 100% biomass concentration was 1.7 g/L, the same value obtained in the fermentation of RB-YE medium (Table 3). DHA content in the biomass grown in RB at 40% was significantly higher (38.3 mg/g), although the highest DHA productivity [10.4 mg/(day L)] was obtained in the fermentation of RB at 80%.

**Table 4** Concentration of biomass, DHA content in the biomass and DHA productivity ( $P_{DHA}$ ) of the RB fermentations by Thraustochytridae sp. M12-X1

RB (%)	Biomass (g/L)	DHA (mg/g)	$P_{DHA}$ [mg/(day L)]
100	1.7 ± 0.20 <sup>a</sup>	16.0 ± 1.5 <sup>c</sup>	9.1 ± 0.5 <sup>a,b</sup>
80	1.4 ± 0.60 <sup>a,b</sup>	22.8 ± 1.3 <sup>b</sup>	10.4 ± 0.9 <sup>a</sup>
40	0.6 ± 0.04 <sup>b,c</sup>	38.3 ± 2.2 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.9 <sup>b</sup>
10	0.3 ± 0.01 <sup>c</sup>	18.2 ± 3.5 <sup>b,c</sup>	1.9 ± 0.5 <sup>c</sup>

Within a column, means without a common superscript letter differ significantly ( $P < 0.05$ )

#### Effect of the growth media on the composition of fatty acids (FAs) produced by the native thraustochytrids

Composition of the FAs produced by C41 and M12-X1 strains in the fermentations of the different C sources (liquid residues, Glu, Malt and Star) supplemented with YE-MSG and nitrogen source mix (CM) (Tables 2, 3) are presented in Tables 5 and 6, respectively. Palmitic acid (C16:0) (24.9–30.9%) and DHA (18.4–27.1%) were the main FAs produced by C41 strain; arachidonic (AA, C20:4n-6) and eicosapentaenoic (EPA, C20:5n-3) acids represented between 9.4 and 19.4% of the total FAs. Odd-chain FAs (C15:0 and C17:0) had a major contribution on the FAs in the biomass from glucose fermentation (26.8%). The highest content of the long chain PUFAs (39.2%) was the one in the FAs from the biomass produced in RB fermentation. FAs in the biomass from RP1 fermentation contained the highest percentage of DHA (27.1%). Nevertheless, this percentage was not significantly ( $P > 0.05$ ) different from those in the FAs of the biomass produced in the fermentations of RP2, Glu and Malt.

FAs produced by M12-X1 strain (Table 6) contained palmitic acid (18.8–28.6%), EPA (7.4–11.3%) and DHA (31.5–61.7%). The highest content of DHA (61.7%) was found in the FAs from the biomass grown in CM; this DHA content was not significantly ( $P > 0.05$ ) different from that in the FAs from the biomass produced in RP2 fermentation.

For both strains, the relative contents of palmitic acid and DHA in the FAs presented different correlations with the biomass concentration (Tables 2–5 and 4–6); while FAs from the biomass produced at higher concentrations contained more palmitic acid, those from biomass produced at lower concentrations contained more DHA.

#### Discussion and conclusions

Strains under study, C41 similar to *S. minutum* (97% identity) and M12-X1 similar to *T. kinnei* (99% identity) produce lipids with different FA profiles, characteristic that has been suggested for grouping these microorganisms

**Table 5** Profiles of the fatty acids produced by *Thraustochytriidae* sp. C41 grown in media based on liquid residues (RP1, RP2 and RB), pure C sources [glucose (Glu) 20 g/L, soluble starch (Star) 20 g/L, maltose (Malt) 20 g/L] and nitrogen source mix (CM)

Fatty acids (% w/w)	RP1	RP2	RB	Glu	Star	Malt	CM
C14:0	3.2 ± 0.20 <sup>a,b</sup>	3.8 ± 0.42 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.12 <sup>a,b</sup>	1.4 ± 0.30	1.4 ± 0.05	1.7 ± 0.48	2.7 ± 0.28 <sup>b</sup>
C15:0	8.5 ± 0.36 <sup>c,d,e</sup>	10.3 ± 2.84 <sup>b,c,d</sup>	4.7 ± 0.53 <sup>c</sup>	15.0 ± 0.30 <sup>a</sup>	13.5 ± 2.70 <sup>a,b</sup>	7.7 ± 0.07 <sup>d,e</sup>	12.2 ± 0.25 <sup>a,b,c</sup>
C16:0 (palmitic acid)	27.5 ± 2.80	30.4 ± 2.09	30.9 ± 2.95	25.0 ± 0.50	27.3 ± 4.50	24.9 ± 3.00	25.5 ± 1.44
C16:1	0.7 ± 0.17	0.6 ± 0.09	1.2 ± 0.12				2.1 ± 0.08
C17:0	4.5 ± 0.17 <sup>b,c</sup>	5.4 ± 1.91 <sup>b,c</sup>	3.1 ± 0.36 <sup>c</sup>	11.8 ± 0.90 <sup>a</sup>	13.0 ± 2.10 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.06 <sup>b,c</sup>	6.6 ± 0.63 <sup>b</sup>
C18:0	0.8 ± 0.06	1.0 ± 0.27	5.5 ± 0.13		2.7 ± 0.06	0.8 ± 0.04	1.3 ± 0.18
C18:1						1.3 ± 0.04	3.2 ± 0.28
C18:2						0.9 ± 0.90	1.4 ± 0.42
C20:4 + C20:5 (AA + EPA)	18.4 ± 0.37 <sup>a</sup>	16.0 ± 2.98 <sup>a,b</sup>	15.2 ± 1.34 <sup>a,b</sup>	14.0 ± 0.80 <sup>b</sup>	9.4 ± 0.80	19.4 ± 0.48 <sup>a</sup>	16.9 ± 1.90 <sup>a,b</sup>
C20:2			3.0 ± 0.36				
C20:3			2.6 ± 0.09				
C22:6 (DHA)	27.1 ± 1.64 <sup>a</sup>	22.3 ± 5.13 <sup>a,b,c</sup>	18.4 ± 2.53 <sup>c</sup>	22.5 ± 0.09 <sup>a,b,c</sup>	19.3 ± 0.42 <sup>b,c</sup>	26.2 ± 3.18 <sup>a,b</sup>	19.2 ± 2.84 <sup>b,c</sup>
Others	9.3 ± 1.29	10.2 ± 0.93	12.4 ± 0.26	10.3 ± 0.20	13.3 ± 0.27	11.2 ± 0.91	8.9 ± 1.10

Within a row, means without a common superscript letter differ significantly ( $P < 0.05$ )

**Table 6** Profiles of the fatty acids produced by *Thraustochytriidae* sp. M12-X1 grown in media based on liquid residues (RP1, RP2 and RB), pure C sources [glucose (Glu) 20 g/L, soluble starch (Star) 20 g/L, maltose (Malt) 20 g/L] and nitrogen source mix (CM)

Fatty acids (% w/w)	RP1	RP2	RB	Glu	Star	Malt	CM
C:6 (adipic acid)				24.9 ± 4.04			
C12:0	0.4 ± 0.06	0.9 ± 0.14	0.5 ± 0.07	0.5 ± 0.03			0.8 ± 0.01
C14:0	3.1 ± 0.39 <sup>b</sup>	4.1 ± 0.26 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.03 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.25 <sup>c</sup>	4.0 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.04 <sup>b,c</sup>
C15:0	4.7 ± 0.74 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.35 <sup>c</sup>	1.1 ± 0.01	7.2 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.20 <sup>c</sup>	5.4 ± 0.38 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.30 <sup>c</sup>
C16:0 (palmitic acid)	23.8 ± 3.21 <sup>b</sup>	22.1 ± 0.70 <sup>b,c</sup>	28.6 ± 0.36 <sup>a</sup>	24.2 ± 0.43 <sup>b</sup>	21.7 ± 1.03 <sup>b,c</sup>	28.5 ± 0.40 <sup>a</sup>	18.8 ± 1.30 <sup>c</sup>
C16:1			0.6 ± 0.11				
C17:0							0.3 ± 0.04
C18:0	0.6 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.17	1.4 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.03 <sup>b</sup>
C18:1				0.9 ± 0.15		1.1 ± 0.18	1.2 ± 0.09
C18:2				1.1 ± 0.04		1.7 ± 0.10	0.3 ± 0.04
C20:3			1.0 ± 0.06				
C20:5 (EPA)	11.3 ± 0.29 <sup>a</sup>	10.2 ± 0.94 <sup>b,c</sup>	10.6 ± 0.03 <sup>a,b</sup>	9.9 ± 0.01 <sup>b,c</sup>	7.4 ± 0.18	9.5 ± 0.12 <sup>c</sup>	10.8 ± 0.06 <sup>a,b</sup>
C22:6 (DHA)	53.1 ± 3.45 <sup>b,c</sup>	57.3 ± 1.19 <sup>a,b</sup>	44.7 ± 0.11 <sup>d,e</sup>	44.1 ± 0.07 <sup>d,e</sup>	39.5 ± 4.90 <sup>e</sup>	47.3 ± 0.58 <sup>c,d</sup>	61.7 ± 3.30 <sup>a</sup>
Others	3.0 ± 0.83	2.2 ± 0.54	5.6 ± 0.42	6.1 ± 0.13	0.98 ± 0.16	1.3 ± 0.66	

Within a row, means without a common superscript letter differ significantly ( $P < 0.05$ )

(Huang et al. 2003). Long chain PUFAs produced by strains C41 and M12-X1 are AA/EPA/DHA and EPA/DHA, respectively; the relative content of these PUFAs is affected by the carbon source. Carbon sources that allow the highest content of DHA in FA from C41 and M12-X1 are RP1 and RP2, respectively.

Composition of the evaluated liquid residues influenced biomass production by the native thraustochytrid strains. The highest biomass concentration was obtained in the fermentation of the beer residue that contained more protein and NFE. Besides, addition of MSG allowed to increase DHA productivity of RB fermentation by M12-X1. DHA

productivity of this fermentation was higher than those of pure carbon sources (Glu, Malt and Star) fermentations suggesting that beer residue contains growth co-factors needed by these heterotrophic microorganisms (phosphate, calcium, Mg, Mn and Fe).

Growth of M12-X1 strain is not inhibited by concentration of beer residue and probably higher biomass concentrations can be obtained after a concentration step. However, the concentration at which the highest DHA productivity is lower than the one that allows the production of the highest biomass concentration. Thus DHA content in the FA would be dependent on biomass

production. The experiments carried out to test the effect of carbon source on FA profile of both native strains show that more palmitic acid is produced under conditions that favor biomass production whereas more DHA is produced under conditions at which less biomass is produced. This behavior suggests the possibility to favor biomass production or DHA accumulation through changes in growth medium composition or in the concentration of the carbon source by using fed-batch fermentations. On the other hand, growth conditions should be controlled in order to avoid biomass growth detention, because after this TFAs and DHA contents in the biomass decrease significantly (Fig. 2). This decrease would be explained by lipid turnover in oleaginous microorganisms that occurs after the carbon source is exhausted (Fakas et al. 2007).

The small reduction in COD (9.7%) during the growth phase in RB fermentation by M12-X1 strain indicates either that another nutrient limits the growth or that this strain is only able to use a small fraction of the carbon source in RB. The non growth rate associated pattern of total FA accumulation in the biomass of M12-X1 strain is in agreement with the hypothesis of nitrogen limitation. In oleaginous microorganisms, lipid accumulation takes place after growth ceases, because a nutrient different from the carbon source, generally nitrogen, becomes limiting.

Our results show that beer residue contains ingredients usable by thraustochytrids. During its fermentation by the M12-X1 strain, the production of a highly valued compound takes place and COD decreases; a prolonged incubation (7 days) allows a more important COD decrease (27.6%) with a significant reduction in DHA productivity. The process described in this work could be an alternative for the production of biodiesel because a FA rich biomass (41.3%) is obtained after 3 days. This biomass could also be used in formulation of diets for fish and crustacean larvae because of its high content of essential PUFAs. We are currently carrying out studies in order to increase biomass production and DHA productivities of RB fermentation by another native thraustochytrid strain.

**Acknowledgments** This work is part of the doctoral thesis of MSc Benita Quilodran at Programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. The authors acknowledge the economical support provided by Dirección de Investigación, Universidad de Los Lagos through Project No 0001906 and Project MECESUP ULA 0202. The authors also acknowledge Mr. Alberto Peters (Casa Cervecería Puerto Montt) for providing the brewery by-product.

## References

- AOAC (1995) Official methods of analysis of official analytical chemists international, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington
- Bajpai PK, Bajpai P, Ward OP (1991a) Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J Am Oil Chem Soc* 68:509–514
- Bajpai P, Bajpai PK, Ward OP (1991b) Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:706–710
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294–306
- Copeman LA, Parrish CC, Brown JA, Harel M (2002) Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210:285–304
- Fakas S, Certik M, Papanikolaou S, Aggelis G, Komaitis M, Galiotou-Panayotou M (2007) Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzym Microb Technol* 40:1321–1327
- Fan KW, Chen F, Jones EBG, Vrijmoed LLP (2001) Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27:199–202
- FAO Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Hinzpeter I (2008) Identification of microorganisms of Thraustochytriales order from the coastal zone in Puerto Montt, Chile, and determination of their potential for the production of docosahexaenoic acid. Doctoral thesis at Natural Resource Science Doctorate Program. Universidad de La Frontera
- Huang J, Aki T, Yocochi 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
- 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
- Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang FS, Teter B, Ubeda O, Salem N, Frautschy SA, Cole GM (2005) A diet rich with omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci* 25:3032–3040
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy* 34:1–5
- Miao X, Wu Q (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol* 97:841–846
- Morris DL (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 107:254–255
- 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
- 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
- Stevens L, Zhang W, Peck L, Kuczak T, Grevstad N, Mahon A, Zentall SS, Arnold LE, Burgess JR (2003) EPA supplementation in children with inattention, hyperactivity, and other disruptive behaviors. *Lipids* 38:1007–1021
- Tacon AGJ, Hasan MR, Subasinghe RP (2006) Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: trends and policy implications. FAO Fisheries Circular No. 1018
- Turchini GM, Torstensen BE, Ng WK (2009) Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev Aquac* 1:10–57

- Uauy R, Hoffmann DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE (2001) Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* 36:885–895
- Unagul P, Assantachai C, Phadungruengluij S, Suphantharika M, Tanticharoen M, Verduyn C (2007) Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic (C22:6n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. *Bioresour Technol* 98:281–287
- Yaguchi T, Tanaka S, Yokochi T, Nakahara T, Higashihara T (1997) Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *J Amer Oil Chem Soc* 74:1431–1434
- Yamasaki T, Aki T, Shinozaki M, Taguchi M, Kawamoto S, Ono K (2006) Utilization of shochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using thraustochytrid. *J Biosci Bioeng* 102:323–327
- Yokochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T (1998) Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:72–76



Contents lists available at ScienceDirect

## Enzyme and Microbial Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/emt](http://www.elsevier.com/locate/emt)

# Docosahexaenoic acid (C22:6n – 3, DHA) and astaxanthin production by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 a native strain with high similitude to *Ulkenia* sp.: Evaluation of liquid residues from food industry as nutrient sources

Benita Quilodrán <sup>a</sup>, Ivonne Hinzpeter <sup>b</sup>, Emilio Hormazabal <sup>c</sup>, Andrés Quiroz <sup>c</sup>, Carolina Shene <sup>d,\*</sup><sup>a</sup> Department of Natural Resources and Environment, Universidad de Los Lagos, casilla 557, Puerto Montt, Chile<sup>b</sup> Department of Government and Management, Universidad de Los Lagos, casilla 557, Puerto Montt, Chile<sup>c</sup> Department of Chemical Sciences, Universidad de La Frontera, casilla 54-D, Temuco, Chile<sup>d</sup> Center of Food Biotechnology and Bioseparations BIOREN and Agri Aquaculture Nutritional Genomic Center, Technology and Process Unit, Universidad de La Frontera, casilla 54-D, Temuco, Chile

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 January 2010

Received in revised form 7 April 2010

Accepted 8 April 2010

## Keywords:

Thraustochytrids  
Polyunsaturated fatty acid  
Docosahexaenoic acid  
Carotenoids  
Starch  
B-vitamins

## ABSTRACT

*Thraustochytriidae* sp. AS4-A1, a native strain with high similitude to *Ulkenia* sp., able to produce docosahexaenoic acid (C22:6n – 3, DHA) and astaxanthin (3,3'-dihydroxy-β,β-carotene-4,4'-dione, ASX) was cultivated in growth media based on liquid residues from potato chip processing, and residual mash recovered from a brewery by-product (RB). DHA productivity of these fermentations was compared to productivities of glucose, maltose and starch fermentations. The percentage of DHA in the total fatty acids was between 10.1% and 23.4% depending on growth media composition. RB, as the only source of nutrients, supported growth ( $8.1 \pm 0.4$  g/L dry weight biomass) and DHA production ( $576 \pm 40$  mg/L); however, its supplementing with yeast extract, monosodium glutamate and B-vitamins (thiamine, biotin and cobalamin) allowed significant increases in DHA productivity (540 mg/L/day), and concentrations of biomass ( $14.9 \pm 0.4$  g/L) and DHA ( $2698 \pm 132$  mg/L). In all the cases DHA production occurred during the growth period. ASX in the biomass was detected in the late growth rate phase; the highest ASX productivity ( $63 \pm 3$  mg/L/day) was obtained in the fermentation of RB as the only source of nutrients.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n – 3) is a long chain omega-3 fatty acid (FA). This essential polyunsaturated fatty acid (PUFA) comprises over 97% of n – 3 PUFA in brain and, in the retina over 95% of n – 3 PUFA is DHA [1]. DHA deficiencies are associated with several diseases (foetal alcohol syndrome, attention deficit hyperactivity disorder, cystic fibrosis, phenylketonuria, unipolar depression, aggressive hostility and adrenoleukodystrophy). It has been shown that dietary DHA has positive effect on diseases such as hypertension, arthritis, atherosclerosis, depression, adult-onset diabetes mellitus, myocardial infarction, thrombosis, and some cancers [2]. At present, the main sources of DHA are oily fish and fish oil. Because marine fish have limited abilities to produce DHA [3] they rely on dietary uptake. In the marine ecosystem DHA production is mostly attributable to phytoplankton. Within the marine environment phytoplankton is also the primary source of astaxanthin (3,3'-dihydroxy-β,β-carotene-4,4'-dione, ASX) a carotenoid with several physiological activities related to its high antioxidant activity [4].

Several studies related to microbial production of DHA and ASX have been published. The red yeast *Xanthophyllomyces dendrophorus* (formerly known as *Phaffia rhodozyma*) and *Haematococcus pluvialis* (microalgae) are the most studied microorganisms for ASX production. Thraustochytrids (Labyrinthulomycetes), marine protists widely found in diverse marine environments have drawn the attention, because their lipids contain long chain PUFAs [DHA, arachidonic acid (C20:4n – 6, ARA), eicosapentaenoic acid (C20:5n – 3, EPA)]; in addition, some strains also produce carotenoids (astaxanthin, zeaxanthin, cantaxanthin, β-carotene, echinenone and phenicoxanthin) [5–9]. Thraustochytrids comprise species belonging to the genera, *Althornia*, *Diplophys*, *Japonochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium* (formerly known as *Schizochytrium*) and *Ulkenia* [10].

Thraustochytrids synthesize extracellular enzymes (e.g. proteases, cellulases, amylases, lipases, gelatinases, chitinases phosphatases, α-glucosidase) [10–12] that enable them to use different substrates [13]. Several works have evaluated the use of food industry residues and by-products for designing cost-effective growth media. In Chile, wet brewer grains, by-product obtained after extracting the mashed malted grains, are used for animal feed without further processing. This by-product has a high content of residual mash (>90%) that is rich in nutrients (protein, soluble carbohydrates and minerals). In the potato chip processing, liquid

\* Corresponding author. Tel.: +56 45 325491; fax: +56 45 325053.

E-mail address: [cshene@ufro.cl](mailto:cshene@ufro.cl) (C. Shene).

wastes that contain starch are produced. At present, these wastes do not have any commercial use in Chile and must be treated before their disposal. In a previous work, the extract from the brewery by-product (RB) and two liquid wastes from potato chip processing were evaluated as sources of nutrient, mainly carbohydrates, for the production of DHA by two native thraustochytrid strains [14]. Although the studied strains, identified and classified as members of *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* genera accumulate FAs with a high percentage of DHA (57% and 27%, respectively), their fermentations exhibited low DHA productivities (55.1 mg of DHA/L/day) because of the low biomass concentrations (less than 2.3 g/L). Recently, a new strain, Thraustochytriidae sp. AS4-A1, presenting similarities with strains of the *Ulkenia* genus was isolated. This being a DHA producer strain and its biomass presents pigmentation due to the production of ASX.

The objective of the present work was to evaluate the potential of a brewery by-product and liquid residues from potato chip processing as carbohydrate sources for DHA and ASX production by Thraustochytriidae sp. AS4-A1. In order to demonstrate the potential of these carbohydrate sources, DHA productivity ( $P_{DHA}$ ) of their fermentations was compared to productivities of glucose, maltose and starch fermentations; ethanol, as carbon source for DHA production, was also evaluated. The growth medium based on the residue that allowed the highest  $P_{DHA}$  was then optimized through addition of nitrogen sources [monosodium glutamate (MSG) and yeast extract (YE)] and B-vitamins (thiamine, biotin and cobalamin).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Monosodium glutamate (MSG) and glucose were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Peptone was obtained from Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England). Yeast extract and agar were obtained from Becton, Dickinson and Co. (Sparks, MD, USA). Streptomycin sulfate, penicillin G, thiamine, biotin, cobalamin, and astaxanthin were obtained from Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany). Biotools deoxynucleotide mix and DNA polymerase were obtained from Biotools B&M Labs (SA, Spain). FAME standards (Mix L209, FAME C20:0, C20:1, C20:4, C22:1 and C22:6) was obtained from Alltech (USA). Composition of artificial sea water (ASW) for 1 L was: NaCl 27.50 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5.38 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6.78 g, KCl 0.72 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.20 g and CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.40 g.

### 2.2. Brewery by-product and potato chip processing liquid residues

The liquid residues from potato chip processing were the bleaching water (RP1), and the water used for a cold washing of peeled potatoes (RP2). The brewery by-product (RB) was the filtrate obtained from wet brewer grains obtained after extracting the mashed malted grains. The liquids were filtered with cheesecloth and then using 1 µm filter paper (Advantec, No. 1). Chemical and elemental compositions of the liquids have been described by Quilodrán et al. [14].

### 2.3. Isolation of the microorganism

Thraustochytriidae sp. AS4-A1 was isolated from water and sediment samples collected in the Puerto Montt coastal zone, Southern Chile (41°28'18"S and 72°56'24"W). During the sampling period, salinity and temperature of water were 30 psu and 12.9 ± 2.7 °C, respectively. Isolation was carried out through the pine pollen baiting method [15]. Briefly, pollen grains (10 mg) were added to the samples (10 mL) before a 7-day incubation period carried out at 25 °C. Pollen grains with attached microorganisms collected by filtration (nylon filter, 20 µm mesh) were spread on agar B (YE 2 g/L, peptone 2 g/L, agar, 10 g/L, and salts in ASW to a final concentration of 70%, w/v) that contained antibiotics (streptomycin sulfate and penicillin G, 300 mg/L each) to avoid bacteria proliferation. Plates were incubated at 25 °C until colonies were visible. Single colonies were subcultivated on B solid medium until pure isolates (microscope inspection) were obtained.

### 2.4. DNA extraction and phylogenetic analysis

Colonies taken from agar plates were suspended with distilled water (200 µL) and centrifuged (8000 × g, 5 min at 4 °C). The cell pellet was re-suspended using the lysis buffer (200 µL, 0.25 M Tris-Cl, 0.1 M Na<sub>2</sub>-EDTA, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate and 0.1 M NaCl, pH 8.2). DNA was extracted by the phenol/chloroform/isoamyl alcohol-extraction and ethanol-precipitation protocol [16]. Purified DNA was dis-

solved with double-distilled water. Five microliter of the DNA solution was mixed with 2.5 µL of 5 mM solution of deoxynucleotides triphosphate (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 5 U of DNA polymerase and 1.25 µM of each primer JVF (5'-TTGATCTGCCAGTAGTCATA T-3') and JVR (5'-CAAACCTGTACGACTTCA-3'). In order to obtain the complete sequence, internal primers were used for sequencing partial regions with overlapping bases. PCR products from the agarose gels were purified using the extraction Kit (V-Gene Biotechnology Ltd, Zhejiang, China). Sequenced DNA fragments (ABI-3100, Applied Biosystem, California, USA), accession number FJ010826, were compared with those available in the GenBank database (National Center for Biotechnology Information, USA: NCBI home page <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The search for the more closely related homologous sequences of related microorganisms, obtained from NCBI Gene Bank, was performed using the BLAST program [17] available at the NCBI web server.

### 2.5. Culture conditions

The inoculum was prepared transferring cells from agar plates to 50 mL of sterile B2 medium (for 1 L: glucose, 20 g, YE, 2 g, MSG, 2 g, salts in ASW to a final concentration of 70% w/v). Incubation was carried out for 48 h at 25 °C in shaking flasks (180 rpm). Sterile growth medium (100 mL) inoculated with 5% (v/v) was incubated at 25 °C in shaking flasks, for 3 or 5 days. In the experiments carried out to test the effect of the carbon source, growth medium contained either YE (2 g/L) or YE-MSG (both at 2 g/L) and the salts in ASW to a final concentration of 70% (w/v). Concentration of glucose, maltose and starch was 20 g/L; ethanol was tested at 2 g/L. Fermentation of YE-MSG was carried out as control medium (CM). Solutions of carbon and nitrogen sources were sterilized (121 °C, 15 min) separately and mixed to give the required concentration. In the experiments carried out to test the effect of RB concentration, the liquid residue was diluted (10–80%, v/v) with distilled water. Before sterilization, pH of the media was fixed (NaOH or HCl) at 7.0, unless specified. In growth medium that contained B-vitamins, 1 mL of a concentrated solution (thiamine 1 mg/L, biotin 0.0005 mg/L and cobalamin 0.0005 mg/L, sterilized by filtration, 0.2 µm) was used. Results are presented as mean ± standard deviation of triplicate assays. Data for the growth curves was obtained from two flasks that were taken out every 24 h for analysis. Results are presented as mean ± standard deviation of duplicate assays.

### 2.6. Analytical methods

#### 2.6.1. Biomass and residual carbohydrate concentration

Biomass was recovered by centrifuging (4000 × g, 10 min, 4 °C), washed three times with sterile distilled water, frozen, lyophilized and its weight gravimetrically determined. Concentration of residual carbohydrate was determined using the anthrone method [18].

#### 2.6.2. Fatty acid analysis

Lyophilized biomass (20–50 mg) was used for direct transesterification [19]. The fatty acid methyl esters (FAMEs) in the hexane layer were collected by centrifuging at 4 °C. The resulting FAMEs were analyzed by GC (FOCUS-Finnigan)/MS (DSQ-Finnigan), equipped with HP Ultra 1 capillary column (30 m long and 0.25 mm inner diameter). Column temperature was programmed from 40 °C to 300 °C with an increase rate of 5 °C/min. A flame ionization detector with helium as a carrier gas (200 °C) was used. The injector was kept at 250 °C. Injection volume was 1 µL. The FAMEs' peaks were identified and quantified using fatty acid standards. Because of column used arachidonic acid (C20:4n – 6, ARA) and eicosapentaenoic acid (C20:5n – 3, EPA) showed the same retention time.

#### 2.6.3. Astaxanthin extraction and analysis

Lyophilized biomass (50 mg) was extracted with acetone (1 mL); and recovered by centrifuging. Extraction was repeated until precipitates were colorless. Petroleum ether (1 mL) and deionized water (1 mL) were added to the pooled acetone extract. The mixture was agitated and left until phase separation; organic phase was recovered and evaporated in nitrogen atmosphere. Astaxanthin analysis was carried out by HPLC using a reverse phase column (Nova-Pak silica, 60 Å, 4 µm, 150 mm long × 2.1 mm diameter, Waters Inc.). Pigment, dissolved in a known volume of the mobile phase (n-hexane: ethyl acetate, 65:35 (v/v) [20]), was eluted at a flow rate of 0.8 mL/min at 40 °C. Astaxanthin was detected at 445 nm and was identified by its retention time with a standard.

#### 2.6.4. Statistics and calculations

One-way ANOVA followed by Duncan multiple comparison tests was used to analyze data. Significance of the effects was determined at 0.05 confidence level. The yield coefficients for biomass and products on total carbohydrates were calculated from the mass ratio between synthesized product and consumed carbohydrates. C:N molar ratio was estimated considering that RB contains 3.22% solids, in which N and C correspond to 1.2% and 50.44%, respectively [14]. It was also assumed that C and N percentages in YE were 17.5% and 10.9% (Technical 28860), respectively; in MSG these percentages were 35.5% and 8.3%, respectively.

**Table 1**

Effect of carbon source on biomass concentration, DHA content in the biomass and TFAs, and DHA productivity ( $P_{DHA}$ ) of *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 fermentations (3 days, flask culture, biomass at inoculation time: 0.0013 g). RP1 and RP2, liquid residues from potato processing; RB, liquid residue from brewery by-product; G, glucose; M, maltose; S, starch; E, ethanol; YE, yeast extract; MSG, monosodium glutamate.

	Biomass (g/L)	DHA (mg/g)	TFA (%)	$P_{DHA}$ (mg/L/day)
RP1/YE	0.9 ± 0.1 <sup>c</sup>	137 ± 19 <sup>a</sup>	31 ± 2 <sup>c</sup>	41 ± 3 <sup>c</sup>
RP2/YE	1.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	1 ± 0 <sup>f</sup>	1 ± 0 <sup>f</sup>	0 ± 0 <sup>e</sup>
RB/YE	3.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	46 ± 6 <sup>bc</sup>	38 ± 3 <sup>b</sup>	57 ± 1 <sup>b</sup>
RP1/YE-MSG	1.3 ± 0.0 <sup>c</sup>	47 ± 2 <sup>bc</sup>	22 ± 2 <sup>d</sup>	20 ± 1 <sup>d</sup>
RP2/YE-MSG	1.2 ± 0.1 <sup>c</sup>	54 ± 1 <sup>bc</sup>	22 ± 1 <sup>d</sup>	21 ± 2 <sup>d</sup>
RB/YE-MSG	5.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	51 ± 5 <sup>bc</sup>	50 ± 5 <sup>a</sup>	88 ± 11 <sup>a</sup>
G/YE-MSG	0.3 ± 0.0 <sup>d</sup>	10 ± 1 <sup>e</sup>	7 ± 1 <sup>e</sup>	1 ± 0 <sup>e</sup>
M/YE-MSG	0.8 ± 0.1 <sup>c</sup>	61 ± 3 <sup>b</sup>	31 ± 2 <sup>c</sup>	16 ± 3 <sup>d</sup>
S/YE-MSG	4.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	54 ± 1 <sup>bc</sup>	39 ± 4 <sup>b</sup>	88 ± 0 <sup>a</sup>
E/YE-MSG	0.3 ± 0.0 <sup>d</sup>	36 ± 4 <sup>cd</sup>	n.d.	4 ± 1 <sup>e</sup>
YE-MSG	0.3 ± 0.0 <sup>d</sup>	19 ± 2 <sup>d</sup>	27 ± 3 <sup>cd</sup>	2 ± 0 <sup>e</sup>

Within a column, means without a common superscript letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

n.d., not determined.

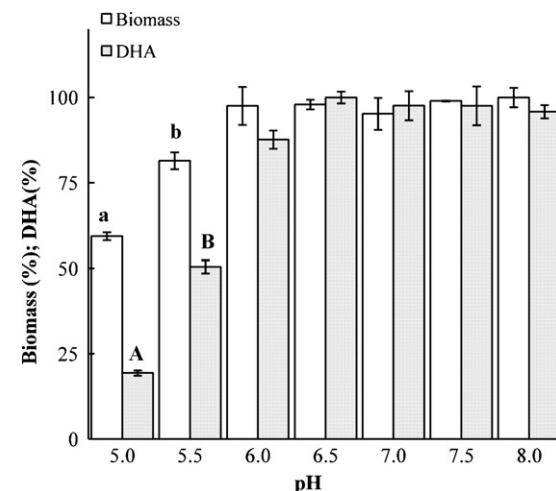
\* Percentage in the biomass.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of growth media composition on biomass and DHA production by *Thraustochytriidae* AS4-A1

**Table 1** shows biomass concentration, contents of DHA and total fatty acids (TFAs) in the biomass, and  $P_{DHA}$  obtained in 3-day fermentations of the different carbon source by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1. The highest biomass concentration ( $5.2 \pm 0.3$  g/L) was obtained in the fermentation of RB/YE-MSG that was not significantly different ( $p > 0.05$ ) from the one obtained in the starch fermentation ( $4.9 \pm 0.1$  g/L). MSG supplementation of RB/YE medium allowed increases in biomass concentration (more than 36%) and the content of TFA in the biomass (more than 30%) with no significant effect on DHA content in the biomass. Glucose and ethanol were poorly fermented by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1; biomass production in the fermentations of these carbon sources was similar to that obtained in the fermentation of the nitrogen sources ( $0.3 \pm 0.0$  g/L). The highest DHA content in the biomass ( $137 \pm 19$  mg/g) was obtained in the fermentation of RP1/YE, while average DHA content in the biomass grown in RB/YE-MSG, RP2/YE-MSG, starch/YE-MSG, and maltose/YE-MSG was  $55 \pm 5$  mg/L. Final pH of the different cultures was found between 7 and 8 (not shown). The fermentations of RB/YE-MSG and starch/YE-MSG presented the highest  $P_{DHA}$  ( $88 \pm 11$  mg/L/day).

Profiles of FAs in *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 grown on the residues based media and pure carbon sources (glucose, starch and



**Fig. 1.** Effect of the initial pH of the RB/YE-MSG medium fermented by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 on biomass and DHA concentrations. Values are percentages of the maximum concentrations: biomass,  $7.7 \pm 0.2$  g/L; DHA,  $736 \pm 13$  mg/L. A different letter near a column indicates this value differs significantly ( $p < 0.05$ ).

maltose) all supplemented with YE-MSG are shown in **Table 2**. Palmitic acid (C16:0), DHA, stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), and linoleic acid (C18:2) were the main FAs; together they represent more than 60% of the total FAs. DHA content in the FAs was found between 10.1% (RB) and 23.4% (RP2). Contribution of ARA+ EPA was found to be between 2.9% (control medium) and 12.8% (maltose). Negative linear correlations between the sum of contributions of stearic acid–oleic acid–linoleic acid and palmitic acid ( $R^2 = 0.684$ ) and between the ARA+ EPA and palmitic acid ( $R^2 = 0.522$ ) were detected.

#### 3.2. DHA and ASX production in growth media based on brewery by-product (RB)

According to the results shown in **Table 1**, the residue with the highest potential for DHA production by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 was RB; thus, experiments were carried out in order to increase DHA productivity of this fermentation. The first examined effect was that of pH; results of the experiments carried out with different initial pH (between 5 and 8) are shown in **Fig. 1**. Lower biomass and DHA concentrations were obtained when the initial pH was lower than 6 during a 5-day fermentation. On the other hand, when the initial pH was between 6 and 8, differences in biomass and DHA concentrations were not significant ( $p > 0.05$ ); average values were  $7.5 \pm 0.1$  g/L and  $704 \pm 35$  mg/L, respectively. In the following experiments initial pH of the RB based growth media was fixed at 7.

**Table 2**

Profile of the fatty acids produced by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 grown with different carbon sources and control medium (CM).

Fatty acids (%)	RP1	RP2	RB	Glucose	Starch	Maltose	CM
C12:0	3.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>ab</sup>	1.0 ± 0.5 <sup>bc</sup>	2.1 ± 1.3 <sup>ab</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>bc</sup>	3.1 ± 0.0 <sup>a</sup>
C14:0	2.5 ± 0.4 <sup>bc</sup>	1.9 ± 0.6 <sup>cd</sup>	2.3 ± 0.0 <sup>c</sup>	1.6 ± 0.0 <sup>d</sup>	2.1 ± 0.0 <sup>cd</sup>	3.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.0 <sup>a</sup>
C15:0	2.0 ± 0.8 <sup>c</sup>	2.8 ± 0.7 <sup>bc</sup>	4.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.7 <sup>bc</sup>	11.5 ± 1.1 <sup>a</sup>
C16:0	37.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	34.6 ± 2.8 <sup>a</sup>	17.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	22.6 ± 2.1 <sup>b</sup>	19.2 ± 1.6 <sup>b</sup>	21.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	34.5 ± 5.8 <sup>a</sup>
C17:0	0.9 ± 0.6 <sup>c</sup>	1.6 ± 0.2 <sup>bc</sup>	6.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.7 <sup>b</sup>	6.6 ± 1.0 <sup>a</sup>
C18:0	9.2 ± 0.5 <sup>c</sup>	9.8 ± 1.0 <sup>c</sup>	13.2 ± 1.1 <sup>ab</sup>	15.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	9.4 ± 0.0 <sup>c</sup>	11.6 ± 0.7 <sup>b</sup>	11.5 ± 0.5 <sup>bc</sup>
C18:1	7.6 ± 0.7 <sup>c</sup>	7.6 ± 0.6 <sup>c</sup>	11.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	6.8 ± 1.6 <sup>c</sup>	17.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	6.8 ± 0.3 <sup>c</sup>	4.5 ± 0.5 <sup>d</sup>
C18:2	6.3 ± 0.3 <sup>c</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	12.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	8.8 ± 2.1 <sup>b</sup>	6.6 ± 0.3 <sup>bc</sup>	5.8 ± 0.9 <sup>c</sup>	4.2 ± 1.1 <sup>c</sup>
C20:2	0.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	1.3 ± 0.5 <sup>c</sup>	1.3 ± 0.0 <sup>c</sup>
C20:3	0.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	2.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>b</sup>
C20:4+C20:5	7.0 ± 0.1 <sup>c</sup>	8.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.4 ± 0.4 <sup>c</sup>	6.7 ± 0.2 <sup>c</sup>	6.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	12.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.8 <sup>d</sup>
C22:6	21.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	23.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	10.1 ± 1.7 <sup>de</sup>	15.1 ± 4.6 <sup>bc</sup>	13.7 ± 0.2 <sup>cd</sup>	19.6 ± 0.1 <sup>ab</sup>	7.5 ± 1.5 <sup>e</sup>
Others	1.8 ± 1.1 <sup>d</sup>	1.6 ± 0.9 <sup>d</sup>	10.5 ± 0.2 <sup>ab</sup>	6.8 ± 0.5 <sup>c</sup>	11.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	8.9 ± 0.2 <sup>bc</sup>	7.0 ± 1.4 <sup>c</sup>

Within a row, means without a common superscript letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

**Table 3**

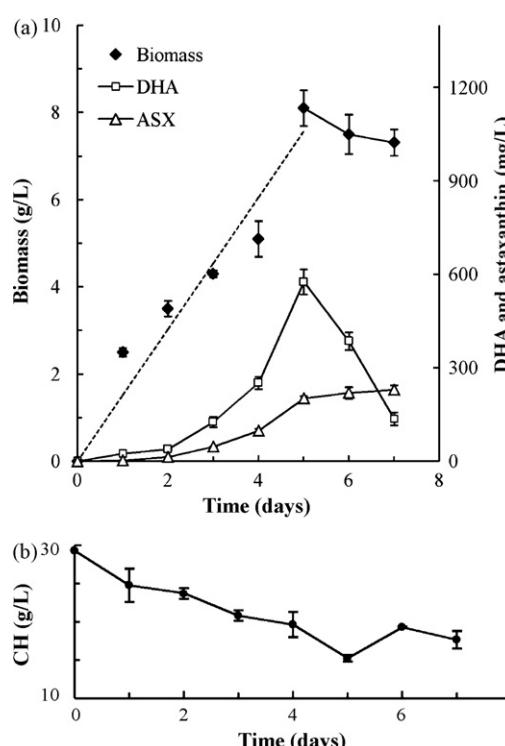
Effect of the concentration of the liquid residue from brewery by-product (RB) on biomass concentration, DHA and ASX contents in the biomass, and DHA and ASX productivities ( $P$ ) of *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 fermentations (5 days, flask culture).

RB (%)	Biomass (g/L)	DHA (mg/g)	$P_{DHA}$ (mg/L/day)	ASX (mg/g)	$P_{ASX}$ (mg/L/day)
100	9.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	55 ± 2 <sup>ab</sup>	99 ± 4 <sup>a</sup>	35 ± 5 <sup>a</sup>	40 ± 5 <sup>b</sup>
80	8.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	42 ± 4 <sup>c</sup>	70 ± 6 <sup>b</sup>	34 ± 2 <sup>a</sup>	57 ± 3 <sup>a</sup>
40	4.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	58 ± 1 <sup>a</sup>	52 ± 3 <sup>b</sup>	29 ± 0 <sup>ab</sup>	26 ± 3 <sup>c</sup>
10	2.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	50 ± 0 <sup>b</sup>	21 ± 0 <sup>c</sup>	21 ± 1 <sup>b</sup>	9 ± 0 <sup>d</sup>

Within a column, means without a common superscript letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

The effect of RB concentration on  $P_{DHA}$  was the second effect evaluated. Table 3 shows the results obtained in the fermentations of RB, as the only source of nutrients, at different concentrations (10–100%, v/v). Biomass concentration presented a linear increase ( $R^2 = 0.984$ ) as the residue concentration increased from 10% to 100% (v/v). The highest DHA content in the biomass (58 ± 1 mg/g) was obtained in the fermentation of RB at 40% (v/v). Through the increase of RB concentration,  $P_{DHA}$  was increased to 99 ± 4 mg/L/day. On the other hand, fermentation of RB at 80% (v/v) showed the highest ASX productivity ( $P_{ASX}$ ) equal to 57 ± 3 mg/L/day.

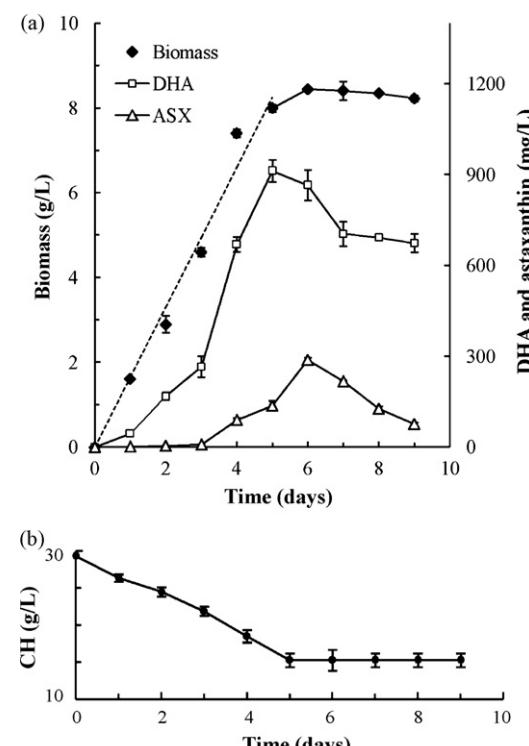
Growth rate and carbohydrate yield coefficients into products in RB fermentation as the only source of nutrients were calculated from data shown in Fig. 2. Biomass and DHA concentrations presented maximum values of 8.1 ± 0.4 g/L and 575 ± 40 mg/L, respectively, after 5 days (Fig. 2a). Prolonged incubations favored ASX production and at day 7 its concentration was 230 ± 15 mg/L. Only a fraction of carbohydrates (48%) in RB were consumed by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 (Fig. 2b). At day 5, carbohydrate yields into biomass ( $Y_{biomass/CH}$ ), DHA ( $Y_{DHA/CH}$ ) and ASX ( $Y_{ASX/CH}$ ) were estimated to be 0.57 g/g, 40.8 mg/g and 14.3 mg/g, respectively. The length of arithmetic growth rate period was 5 days, during which biomass concentration increased at a rate of 1.51 g/day.



**Fig. 2.** Concentrations of biomass, DHA, ASX (a) and residual carbohydrate (CH) (b) in the fermentation of RB as the only source of nutrients by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1. Dotted line represents biomass in the arithmetic growth rate phase (slope = 1.51 g/day).

Because MSG showed an effect on DHA content in the biomass and biomass concentration in the fermentation of RB (Table 1), experiments were carried out to test the effects of YE (0–2 g/L) and MSG (0–2 g/L) separately (Table 4). The results showed a negative effect of YE on biomass concentration; 4.8 ± 0.1 g/L of dry biomass was obtained in RB/YE fermentation compared with 9.0 ± 0.7 g/L in the fermentation of pure RB. However, biomass grown in the YE supplemented medium contained significantly more DHA (96 ± 8 mg/g), compared to that obtained in the fermentation of pure RB (55 ± 2 mg/g). The highest  $P_{DHA}$  (187 ± 5 mg/L/day) was that of RB/YE-MSG fermentation. ASX content in the biomass slightly increased after RB based medium was supplemented with MSG (39 ± 6 mg/g); however, the highest  $P_{ASX}$  (63 ± 3 mg/L/day) was obtained in the fermentation of pure RB.

Changes in the biomass, DHA and ASX concentrations were noted in the fermentation of RB supplemented with YE and MSG both at a concentration of 2 g/L (Fig. 3a). In this case, the highest concentrations of biomass (8.5 ± 0.1 g/L) and ASX (288 ± 8 mg/L) were reached at day 6, while the highest DHA concentration (913 ± 37 mg/L) was reached at day 5. Carbohydrate consumption was not affected by nitrogen addition; thus,  $Y_{biomass/CH}$  (0.60 g/g) and  $Y_{DHA/CH}$  (64.6 mg/g) were higher than the values obtained in the fermentation of pure RB while  $Y_{ASX/CH}$  (9.7 mg/g) was smaller. In this growth medium, biomass concentration increased until day 5 at a rate of 1.65 g/day.



**Fig. 3.** Concentrations of biomass, DHA, ASX (a) and residual carbohydrate (CH) (b) in the fermentation of RB/YE-MSG by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1. Dotted line represents biomass in the arithmetic growth rate phase (slope = 1.65 g/day).

**Table 4**

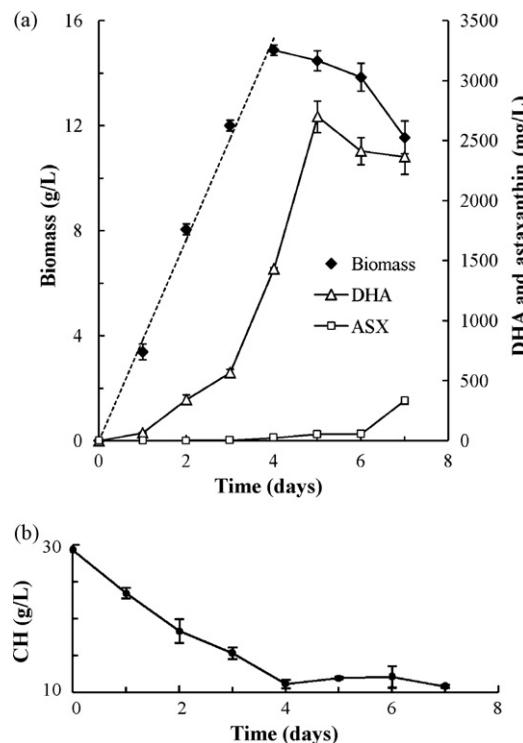
Effect of the concentrations of yeast extract (YE) and monosodium glutamate (MSG) in the RB based media on the biomass concentrations, DHA and ASX contents in the biomass, and DHA and ASX productivities of *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 fermentations (5 days, flask culture).

YE (g/L)	MSG (g/L)	C:N	Biomass (g/L)	DHA (mg/g)	$P_{DHA}$ (mg/L/day)	ASX (mg/g)	$P_{ASX}$ (mg/L/day)
0	0	49.0	9.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	55 ± 2 <sup>c</sup>	99 ± 4 <sup>b</sup>	35 ± 2 <sup>a</sup>	63 ± 3 <sup>a</sup>
2	0	32.0	4.8 ± 0.1 <sup>c</sup>	96 ± 8 <sup>b</sup>	92 ± 9 <sup>b</sup>	2 ± 0 <sup>c</sup>	1 ± 0 <sup>c</sup>
0	2	35.8	7.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	50 ± 4 <sup>c</sup>	75 ± 9 <sup>c</sup>	39 ± 6 <sup>a</sup>	58 ± 10 <sup>a</sup>
2	2	26.2	8.0 ± 0.0 <sup>ab</sup>	117 ± 4 <sup>a</sup>	187 ± 5 <sup>a</sup>	15 ± 3 <sup>b</sup>	24 ± 4 <sup>b</sup>

Within a column, means without a common superscript letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 4a** shows the changes in biomass, DHA and ASX concentrations in RB/YE-MSG medium supplemented with B-vitamins. The highest biomass ( $14.5 \pm 0.4$  g/L) and DHA ( $2698 \pm 132$  mg/L) concentrations were reached after 4 and 5 days, respectively. ASX production that started after the second day, increased steadily until day 7 reaching a concentration of  $333 \pm 29$  mg/L. Carbohydrate consumption (63%) was favored through B-vitamin supplementation (**Fig. 4b**). Values of the yield coefficients  $Y_{\text{biomass}/\text{CH}}$  and  $Y_{\text{DHA}/\text{CH}}$  were  $0.82$  g/g and  $78.6$  mg/g, higher than those estimated for the fermentations of RB and RB/YE-MSG; on the contrary the lowest value of  $Y_{\text{ASX}/\text{CH}}$  ( $1.3$  mg/g) was obtained under this growth condition. Growth rate period was shortened to 4 days (**Fig. 4a**), during which biomass concentration increased at a rate of  $3.83$  g/day.

Contents of main FAs in the biomass grown in RB, RB/YE-MSG and RB/YE-MSG plus B-vitamins, at the time at which the highest biomass concentration was obtained, are compared in **Fig. 5**. The contents of palmitic and oleic acids were not significantly different ( $p > 0.05$ ) in the biomass grown in the different media. However, significant differences ( $p < 0.05$ ) were detected in the contents of linoleic acid, DHA, and ARA + EPA; linoleic acid content was higher in the biomass grown in RB while the others were higher in the biomass grown in the supplemented RB media.



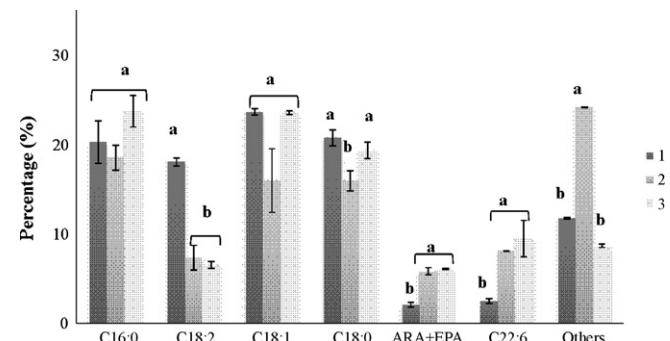
**Fig. 4.** Concentrations of biomass, DHA, ASX (a) and residual carbohydrates (CH) (b) in the fermentation of RB/YE-MSG supplemented with B-vitamins by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1. Dotted line represents biomass in the arithmetic growth rate phase (slope =  $3.83$  g/day).

### 3.3. Morphological and genetic identification

According to its 18S rRNA sequence *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 is similar to *Ulkenia* sp. (99%). The following morphological characters were observed during the growth of *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 on agar plates: colonies were small exhibiting a creamy to hard texture and in older cultures they presented pink to red coloration; generation of ectoplasmic net elements was not detected. The strain developed a large sporangium (larger than  $50$   $\mu$ m); sometimes sporangium took the form of an amoeba after which zoospores were released through a pore; zoospores were also released when zoosporangium was round. Partial cell wall disintegration after zoospores were released, described for strains in *Ulkenia* genus [21], was observed.

## 4. Discussion of the results

The subject of the present study shows a high similarity to strains in genus *Ulkenia*, i.e. *Ulkenia* sp. (99%). In addition several morphological characteristics of cells and colonies, PUFA profile and the capability to produce carotenoid pigments (ASX) [21] suggest that *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 is an *Ulkenia* strain. Few works describe DHA production through strains in genus *Ulkenia* or their growth characteristics. Fan et al. [22] reported biomass concentrations and DHA content in the biomass of  $4.7$  g/L and  $5.5$  mg/g, respectively, in the fermentation of a glucose-YE medium by *Ulkenia* sp. KF13. In the fermentation of a more complex medium (potassium phosphate,  $3$  g/L; ammonium sulfate,  $2$  g/L; corn liquor,  $0.7$  g/L and glucose,  $60$  g/L) by *Ulkenia* sp. SAM 2179 Tanaka et al. [23] obtained  $19.5$  g/L of biomass with  $46.2\%$  DHA in the FAs. Unlike KF13 and SAM 2179 strains, *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 does not grow on glucose at a concentration of  $20$  g/L (**Table 1**). Probably at this concentration the growth is inhibited and lower concentrations should be tested. The best carbon source for biomass production this strain is starch. Among the evaluated residues, that from brewery by-product (RB) is the one with the high content of carbohydrates ( $29.1$  g/L) and this would explain the higher biomass concentration obtained in its fermentation. The similarity of the



**Fig. 5.** Comparison of the main FAs produced by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 grown in RB, RB/YE-MSG, and RB/YE-MSG plus B-vitamins at the time at which the highest biomass concentration was obtained. A different letter near a column indicates this value differs significantly ( $p < 0.05$ ).

results obtained in the fermentations of RB and starch suggests that the carbohydrate fraction in RB used by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 would be starch.

Profile of the FAs produced by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 is characterized by high contents of stearic, oleic, and linoleic acids (between 20.2% and 37.5%), whose relative contributions are dependent on the composition of growth medium (carbon source, nitrogen content and vitamins). Profile of the FAs produced by 366 *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 is similar to that reported for *Ulkenia* KF13 characterized by the content of stearic acid (11.7%), oleic acid (18.2%), linoleic acid (4.3%) and linolenic acid (0.5%) [22]. The content of these FAs could be a distinctive trait among *Ulkenia* strains when compared with *Schizochytrium* and *Thraustochytrium* strains.

Nitrogen (YE-MSG) supplementation of the RB based medium allowed for an increase in biomass production (4%) and DHA concentration (58%). Nevertheless, the most important increase was obtained when RB/YE-MSG medium was supplemented with B-vitamins [thiamine, biotin and cobalamin (B<sub>12</sub>)]. Biotin is a cofactor for several essential carboxylase enzymes [31], including acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase, which is involved in FA synthesis. Thiamine is a cofactor for a number of enzymes involved in primary carbohydrate and branched-chain amino acid metabolism [24]. Cobalamin acts as a cofactor for the enzymes that catalyze either rearrangement-reduction reactions or methyl transfer reactions. Cobalamin auxotrophy, in some algae, is explained because they contain only a B<sub>12</sub>-dependent methionine synthase (MetH) while others that also contain a B<sub>12</sub>-independent methionine synthase (MetE) can grow in the absence of the vitamin [25].

In RB/YE-MSG medium supplemented with B-vitamins, not only did DHA content in the biomass increased (162%), but also biomass concentration (79%) compared with that obtained in the fermentation of RB as the sole source of nutrients. The simultaneous increases in biomass concentration and DHA content in the FAs resulted in a 369% increase in DHA concentration. DHA productivity (540 mg/L/day) of the improved growth medium fermentation by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 is 10 times higher than those obtained in fermentations of RB by other native thraustochytrid strains [14] and is comparable to those reported for *Schizochytrium* KH105 (0.6 g/L/day) and *Schizochytrium limacinum* SR21 (0.8 g/L/day) in a semi-optimized growth medium [6,26].

Relative contribution of the FAs produced by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 is dependent on the carbon source that also influences biomass concentration (Table 2). Cells cultivated in those carbon sources that allowed the production of higher biomass concentrations (RB and starch) contained less DHA and more intermediaries (C17:0, C18:1, C20:2, and C20:3). The opposite was found in cells grown in RP1, RP2 and maltose, in which lower biomass concentrations were obtained. These results suggest a negative control in the late reactions in DHA synthesis when cell activity is increased through changes in the carbon source. However, when growth rate of *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 in RB medium was increased through nitrogen and B-vitamin supplementing, the relative contribution of ARA + EPA and DHA increased, while that of linolenic acid decreased (Fig. 5). These results indicate that some component in the nitrogen sources increases the activity of the enzymes involved in the conversion of FA precursors into more unsaturated FAs. Thus, under optimized conditions FA profile of *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1, could be similar to the one reported for *Ulkenia* sp. at industrial scale [C14:0 3%, C16:0 30%, C18:0 1%, C22:5(n-6) 11%, C22:6(n-3) 46%] [27].

The production of ASX, the other valuable product synthesized by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1, follows a behavior different from that of DHA production, due to changes in the composition of the growth medium based on RB. The highest ASX concentration is reached towards the end of the growth rate phase. This behavior suggests that the pigment is a secondary metabolite not essential

for the growth whose synthesis could be triggered by a nutrient depleting stress. This would be corroborated by the results obtained in the fermentations of RB, RB/YE-MSG and RB/YE-MSG plus vitamins in which as more biomass is produced, ASX content in the biomass decreases. On the other hand, a negative linear correlation ( $R^2 = 0.693$ ) between DHA and ASX content in the biomass was detected when the C:N ratio was changed. This behavior correlates well with that reported for *Schizochytrium* KH105, for which a low nitrogen concentration favored ASX production [6]. The highest  $P_{ASX}$  ( $63 \pm 3$  mg/L/day) in the 5-day fermentation of pure RB is much higher than those reported for *Schizochytrium* KH105 (1.5 mg/L/day) grown in glucose (10%, w/v) with a very low nitrogen concentration (less than 0.3%) [6], and *H. pluvialis* (1.9 mg/L/day) [28]. In the fermentation of glucose with a distillery residue as nitrogen source by *Schizochytrium* KH105, the highest ASX concentration was 7.7 mg/L [29] much lower than that obtained in the fermentation of pure RB by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 ( $229 \pm 15$  mg/L), after 7 days. The ASX content in the biomass of AS4-A1 strain (3%) is comparable with that reported in *H. pluvialis* (3.0–3.5%) the main commercial ASX source [30]. Because thraustochytrids are heterotrophic microorganisms, their use in ASX production at industrial scale would offer advantages over phototrophic microorganisms such as *Haematococcus*.

## 5. Conclusions

Morphological characteristics of cells and colonies, PUFA profile, capability to produce carotenoid pigments (ASX) and the high similarity (99%) to strains in genus *Ulkenia* according to its 18S rDNA strongly support that *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 is a *Ulkenia* strain. This strain is able to produce biomass containing DHA when it is cultivated in different liquid residues from the food industry. The highest biomass concentration was obtained in the fermentation of the liquid recovered from a brewery by-product (RB). While supplementation of RB growth medium with YE and MSG allowed to increase  $P_{DHA}$  (from  $115 \pm 8$  mg/L/day to  $183 \pm 7$  mg/L/day), the highest productivity (540 mg/L/day) was obtained after thiamine, biotin and cobalamin supplementation. The results demonstrate that the brewery by-product is an excellent source of nutrients for the production of DHA and ASX; thus these two high valued molecules could be produced by using a growth medium similar to that used for beer production or by using the residue as a cost-effective source of nutrients.

## Acknowledgements

This work is part of the doctoral thesis of MSc Benita Quilodrán at Programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. The authors acknowledge the economical support provided by Dirección de Investigación, Universidad de Los Lagos through Project No. 0001906 and Project MECESUP ULA 0202. Economic support provided by Dirección de Investigación at Universidad de La Frontera through Convenios de Desempeño I, II and GAP is also acknowledged.

## References

- [1] Kuratko CN, Salem N. Biomarkers of DHA status. Prostaglandins Leukotri Essent Fatty Acids 2009;81:111–8.
- [2] Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). Pharmacol Res 1999;40:211–25.
- [3] Sargent JR, Henderson RJ, Tocher DR. The lipids. In: Halver J, editor. Fish nutrition. 2nd ed. NY: Academic Press; 1989.
- [4] Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends Biotechnol 2003;21:210–6.
- [5] Carmona ML, Nagamuna T, Yamaoka Y. Identification by HPLC-MS of carotenoids of the *Thraustochytrium* CHN-1 strain isolated from the Seto Inland Sea. Biosci Biotechnol Biochem 2003;67:884–8.

- [6] Aki T, Hachida K, Yoshinaga M, Katai Y, Yamasaki T, Kawamoto S, et al. Thraustochytrids as a potential source of carotenoids. *J Am Oil Chem Soc* 2003;80:789–94.
- [7] Armenta RE, Burja A, Radianingtyas H, Barrow CJ. Critical assessment of various techniques for the extraction of carotenoids and co-enzyme Q10 from the thraustochytrid strain ONC-T18. *J Agric Food Chem* 2006;54:9752–8.
- [8] Burja AM, Radianingtyas H. Marine microbial-derived nutraceutical biotechnology: an update. *Food Sci Technol* 2005;19:14–6.
- [9] Burja AM, Radianingtyas H, Windust A, Barrow CJ. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;72:1161–9.
- [10] Raghukumar S. Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *Eur J Protistol* 2002;38:127–45.
- [11] Bremer G. Isolation and culture of thraustochytrids. In: Hyde K, Pointing S, editors. *Marine mycology—a practical approach*. Hong Kong: Fungal Diversity Press; 2000.
- [12] Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S, Hayashi M. Extracellular enzymes produced by marine eukaryotes, thraustochytrids. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:180–2.
- [13] Goldstein S. Development and nutrition of new species of *Thraustochytrium*. *Am J Bot* 1963;50:271–9.
- [14] Quilodrán B, Hinzpeter I, Quiroz A, Shene C. Evaluation of liquid residues from beer and potato processing for the production of docosahexaenoic acid (C22:6n – 3, DHA) by native thraustochytrid strains. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;25:2121–8.
- [15] Gaertner A. Eine Methode des quantitativen Nachweises niederer mit Pollen köderbarer Pilze im Meerwasser und im Sediment. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh Suppl* 1968;3:75–92.
- [16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- [17] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman D. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- [18] Morris DL. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 1948;107:254–5.
- [19] Lewis TE, Nichols PD, McMeekin TA. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *J Microbiol Methods* 2000;43:107–16.
- [20] Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, de la Torre-Boronat MC, López-Sabater MC. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in human plasma and low-density lipoproteins. *J Chromatography B* 2001;758:315–22.
- [21] Yokoyama R, Salleh B, Honda D. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato phylogeny based on morphology, chemotaxonomical characteristics and 18S rRNA gene (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochoytrium*, *Parietichytrium* and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience* 2007;48:329–41.
- [22] Fan KW, Chen F, Jones EB, Vrijmoed LL. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001;27:199–202.
- [23] Tanaka S, Yaguchi T, Shimizu S, Sogo T, Fujikawa S. Process for preparing docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid with *Ulkenia*. United States Patent 6509178; 1999.
- [24] Schowen R. Thiamine-dependent enzymes. In: Sinnott M, editor. *Comprehensive biological catalysis*, vol. 2. San Diego, CA: Academic Press; 1998.
- [25] Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren M, Smith AG. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 2005;438:90–3.
- [26] Yokochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;49:72–6.
- [27] Kiy T, Rusing M, Fabritius D. Production of docosahexaenoic acid (DHA) by the marine microalga, *Ulkenia* sp. In: Cohen Z, Ratledge C, editors. *Single cell oils*. Champaign, IL, USA: American Oil Chemists Society; 2005.
- [28] Tjahjono AE, Kakizono T, Hayama Y, Nishio N, Nagai S. Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis* and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. *J Ferment Bioeng* 1994;77:352–7.
- [29] Yamasaki T, Aki T, Shinozaki M, Taguchi M, Kawamoto S, Ono K. Utilization of shochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using thraustochytrid. *J Biosci Bioeng* 2006;102:323–7.
- [30] Olaizola M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25000-liter outdoor photobioreactors. *J Appl Phycol* 2000;12:499–506.
- [31] Streit WR, Entcheva P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;61:21–31.