

## Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3

By I. Hinzpeter<sup>1</sup>, C. Shene<sup>2\*</sup> and L. Masson<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Gobierno y Empresa. Universidad de Los Lagos. Casilla 557. Puerto Montt. Chile. E-mail: ihinzpeter@ulagos.cl

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Química. Universidad de La Frontera. Casilla 54-D. Temuco. Chile. E-mail: cshene@ufro.cl. Fono: 56 45 325050. Fax: 56 45 325053

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Casilla 233. Santiago. Chile. E-mail: lmasson@ciq.uchile.cl

### RESUMEN

#### Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3

Actualmente, los aceites de pescado son la principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) del tipo omega-3 ( $\omega$ 3) como el ácido eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3) y el ácido docosahexaenoico (C22:6 $\omega$ 3). Se estima que en los próximos años la demanda por AGPI  $\omega$ 3 aumentará debido al crecimiento de la industria acuícola y al incremento en la demanda de AGPI específicos para la elaboración de suplementos alimenticios para humanos y animales. Fuentes alternativas para la producción de AGPI  $\omega$ 3 son bacterias, hongos, microalgas y thraustochytridos. La productividad de estos sistemas depende de las cepas y condiciones de fermentación. En general, las bacterias presentan bajas concentraciones de AGPI; las microalgas producen mezclas de AGPI; la productividad de los cultivos de hongos es baja debido a los largos tiempos de fermentación. A diferencia de éstos, los cultivos heterotróficos de thraustochytridos presentan altas concentraciones de AGPI  $\omega$ 3 y varias cepas son capaces de producir un único AGPI  $\omega$ 3. Para que estas fuentes se transformen en alternativas reales de producción de AGPI  $\omega$ 3 es necesario optimizar los procesos de fermentación y desarrollar las tecnologías para la producción a gran escala.

**PALABRAS-CLAVE:** Aceites marinos - DHA - Protistas marinos - Suplemento alimenticio - Thraustochytridos.

### SUMMARY

#### Biotechnological alternatives for omega-3 polyunsaturated fatty acids production

Fish oils are the main sources of omega-3 ( $\omega$ 3) polyunsaturated acids (PUFA) such as eicosapentaenoic (C20:5 $\omega$ 3) and docosahexaenoic (C22:6 $\omega$ 3) acids. World demand for  $\omega$ 3 PUFA shows an increasing trend mainly due to the growth of the aquaculture industry and also due to the increasing demand for specific PUFA used as food supplements. Bacteria, fungi, microalgae and thraustochytrids are biotechnological PUFA alternatives to fish oils. These sources are characterized by specific PUFA profiles whose productivity depends on strain and growth conditions. PUFA content in bacteria is low; microalgae synthesize mixtures of PUFA; fungi system productivity is low due to long

fermentation times. In heterotrophic cultures of thraustochytrids high concentrations of PUFA can be obtained. Moreover, many strains are able to synthesize a single  $\omega$ 3 PUFA. The optimization of fermentation systems and the development of technology capable of large-scale production are needed in order to make these alternatives feasible.

**KEY-WORDS:** DHA - Food supplement - Marine oils - Marine protists - Thraustochytrids.

### 1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos, constituyentes de los triacilglicerol, son necesarios para todos los seres vivos, pues no sólo son una fuente de energía, sino que además son fundamentales para el crecimiento, desarrollo y reproducción. Aquellos ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces se denominan ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). El ácido linoleico (C18:2 $\omega$ 6) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 $\omega$ 3) son los ácidos grasos esenciales que dan origen a las familias de ácidos grasos  $\omega$ 6 y  $\omega$ 3, respectivamente.

Los AGPI son constituyentes de las membranas celulares y forman parte de los sistemas de señalización celular. Su deficiencia puede afectar negativamente la función celular y eventualmente puede conducir a la muerte. En particular, el AGPI de cadena larga de la serie  $\omega$ 3, ácido eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3, EPA), ha sido objeto de diversas investigaciones debido a sus efectos beneficiosos observados en los lípidos plasmáticos de personas con cardiomiopatías coronarias, en el cáncer y en la artritis reumatoide. Desde el punto de vista fisiológico, una de las funciones más importantes de los AGPI es la de ser precursores de los eicosanoides, compuestos de veinte átomos de carbono (C20). Los eicosanoides corresponden a prostaglandinas, prostaciclina y leucotrienos (Simopoulos, 1991). Los eicosanoides derivados de los AGPI  $\omega$ 6 tienen propiedades fisiológicas diferentes a aquellos que se

originan de los AGPI  $\omega$ 3. Las prostaglandinas se sintetizan por medio de la oxidación de los ácidos  $\gamma$ -linolénico (C18:3 $\omega$ 6, GLA), araquidónico (C20:4 $\omega$ 6, AA) y EPA, los cuales regulan funciones secretoras, digestivas, reproductivas, procesos inmunológicos y de circulación sanguínea. Aquellos eicosanoides derivados de los AGPI  $\omega$ 3 presentan efectos beneficiosos sobre todo en trastornos de origen inflamatorio. La síntesis de estas moléculas C20 es mediada por las mismas enzimas, las que parecen no tener una particular preferencia por el sustrato. Por lo tanto, el balance en la ingestión de ácidos grasos  $\omega$ 3 y  $\omega$ 6 determinará el tipo y cantidad de eicosanoides en el organismo (Sayanova y Napier, 2004).

El ácido docosahexaenoico (C22:6 $\omega$ 3, DHA) ha sido reconocido como un componente importante de la leche materna, y contribuye al normal desarrollo del cerebro y el sistema nervioso de los recién nacidos (Nettleton, 1993; Uauy *et al.*, 1996; Sinclair y Abedin, 2001). Se han sugerido posibles funciones de los AGPI frente a otros desórdenes (asma, dislexia, depresión, y algunas formas de cáncer), aún cuando se requiere de mayor evidencia científica.

Diversos países, entre los que se incluyen los escandinavos y Canadá, han establecido valores para el consumo diario de ácidos grasos  $\omega$ 3. Estas recomendaciones se encuentran en el intervalo de 1 a 1,5 g para adultos. Distintas investigaciones han demostrado la esencialidad de los AGPI  $\omega$ 3 en la formulación de alimentos empleados en acuicultura (peces y larvas de crustáceos). Normalmente, la dieta para el cultivo de muchas especies marinas requiere alrededor del 1 al 2% de AGPI de cadena larga (Rees *et al.*, 1994; Salhi *et al.*, 1994).

El ser humano acepta fisiológicamente cualquier tipo de lípidos; sin embargo, es importante mantener un equilibrio entre éstos. Una dieta adecuada podría contener un 15% de proteínas, 55% de hidratos de carbono y 30% de lípidos. No obstante, en la dieta de algunas sociedades occidentales, la proporción de lípidos es superior al 43% (Mataix, 2002). La calidad de estos lípidos no es la mejor y se estima que la relación  $\omega$ 6: $\omega$ 3 en la dieta de esta población varía entre 11:1 y 20:1. Esta relación es significativamente diferente a los valores recomendados, 1:1 a 4:1, correspondientes a la proporción encontrada en la leche materna (Saglik e Imre, 2001; Mataix, 2002).

## 2. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

La información disponible permite señalar que existen dos mecanismos para la biosíntesis de AGPI, uno aeróbico, que ocurre en animales y algunos microorganismos eucarióticos como *thraustochytrids*, y otro anaeróbico, el cual ocurre en bacterias y eucarióticos como *Schizochytrium sp* (Qiu *et al.*, 2001).

Es sabido que el DHA se sintetiza en el retículo endoplasmático utilizando AGPI como precursores,

mediante el mecanismo aeróbico denominado así ya que requiere oxígeno molecular. La biosíntesis involucra la desaturación y elongación de la cadena hidrocarbonada, procesos en los que intervienen los sistemas enzimáticos  $\Delta$ 6,  $\Delta$ 5 y  $\Delta$ 4 desaturasa para llegar hasta DHA. Estas enzimas participan en la primera etapa de síntesis de EPA. La identificación de estas enzimas ha permitido corroborar el mecanismo de la biosíntesis en mamíferos y en diferentes microorganismos (Metz *et al.* 2001; Qiu, 2003). No obstante, Sprecher (1996) ha sugerido que la síntesis de DHA es independiente de la  $\Delta$ 4 desaturasa la que ocurriría por una retroconversión de C24 a través de una  $\beta$  oxidación (Qiu, 2003).

En general, los AGPI se sintetizan comenzando por un ácido graso monoinsaturado, el ácido oleico (C18:1 $\omega$ 9). La elongación de la cadena tiene lugar cuando dos átomos de carbono pasan desde el donador (acetil CoA o malonil CoA) a la cadena del ácido graso. En la ruta de los  $\omega$ 3, la desaturación produce ácido linoleico y ácido  $\alpha$ -linolénico. El primer doble enlace es introducido entre el carbono 12 y 13 del ácido oleico, dando origen al ácido linoleico. El segundo doble enlace se introduce entre los carbonos 15 y 16 del ácido linoleico formándose el ácido  $\alpha$ -linolénico. Secuencias de pasos de elongación y desaturación de estas moléculas permiten la síntesis de DHA. Este mecanismo ha sido encontrado en la alga roja *Porphyridium yezoensis narawaense* y en *Mortierella alpina*, *Chlorella stigmatophora*, *Nannochloropsis salina*, *Chlorella sp.* y *Cryptheconidium cohnii* (Bajpai y Bajpai, 1993).

Meyer *et al.* (2003), en estudios *in vivo* utilizando sustratos radioactivos, comprobaron que *Thraustochytrium sp.* puede producir DHA a partir de ácido docosapentaenoico (C22:5 $\omega$ 3, DPA) utilizando  $\Delta$ 4 desaturasa. Este microorganismo ha servido como modelo para el estudio del mecanismo de producción de DHA (Qiu *et al.*, 2001).

En el caso de los AGPI  $\omega$ 6, la biosíntesis se basa en dos reacciones que producen ácido araquidónico (C20:4 $\omega$ 6, AA). En la *Cryptomonas danica* y en la alga roja *Porphyridium cruentum* ocurre la desaturación del ácido linoleico a GLA, paso que es seguido por la elongación de la cadena hasta AA. Las algas *Euglena gracilis* y *Asitaria longa* sintetizan AA elongando la cadena del GLA, la que es seguida por la desaturación (Bajpai y Bajpai, 1993).

El segundo mecanismo de biosíntesis de AGPI es el denominado PKS, también llamado paso anaeróbico de la poliketido sintetasa, que incluye un gran número de enzimas. El nombre anaeróbico se utiliza ya que el proceso no requiere oxígeno molecular, pero puede ocurrir en condiciones aeróbicas.

## 3. FUENTES DE OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

Los AGPI  $\omega$ 6 como el ácido linoleico, se encuentran en diversas semillas (cártamo, girasol, poroto de soja, maíz, ajonjolí). El GLA está presente

en la prímula, borraja, etc.; el AA se encuentra en vísceras, carnes animales, huevos y leche. Entre los AGPI  $\omega$ 3 el ácido  $\alpha$ -linolénico está presente en el aceite de semilla de linaza, chía, rosa mosqueta y cantidades moderadas en soja, nuez, pepita de calabaza, etc.

Diferentes recursos marinos se caracterizan por su alto contenido de AGPI  $\omega$ 3. Entre éstos se encuentran los bivalvos mitílidos, específicamente *Perna canaliculus* (Sinclair *et al.*, 2000). El contenido medio de AGPI  $\omega$ 3 en *P. canaliculus*, *Mytilus edulis* y *M. chilensis* es, respectivamente, 0,5, 0,4, y 0,65 g por 100 g de carne.

En la actualidad, la principal fuente de AGPI  $\omega$ 3 son los aceites de pescado de origen marino. La composición y cantidad dependerá no solo de la especie sino también de la época del año y del lugar geográfico donde se produce la captura. Los organismos marinos obtienen los AGPI  $\omega$ 3 desde el fitoplancton, bacterias autotróficas marinas y componentes del zooplancton (Iwamoto y Sato, 1986). El fitoplancton es la principal fuente de alimento de los herbívoros filtradores marinos y el principal aporte de ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico. Sin embargo, no todos los grupos fitoplanctónicos contienen las mismas proporciones de ácidos grasos. Las diatomeas poseen altas concentraciones de EPA y ausencia de ácidos grasos insaturados de 18 carbonos, mientras que los dinoflagelados son ricos en DHA.

## Bacterias

La síntesis de AGPI  $\omega$ 3 por bacterias depende no solo del microorganismo sino también de las condiciones ambientales en las que se desarrollan. No obstante, la producción bajo condiciones de crecimiento controladas permite obtener productos consistentes y reproducibles. La producción de AGPI a través de bacterias es atractiva ya que algunas especies sintetizan sólo un ácido graso, a diferencia de la compleja mezcla producida por microalgas o acumulada en los peces (Russell y Nichols, 1999). Sin embargo, en muchos sistemas la concentración de lípidos es baja (Nichols *et al.*, 2002). Las bacterias productoras de AGPI, en particular EPA y DHA, pertenecen a los géneros *Shewanella*, *Colwellia* y *Moritella* de la división Proteobacteria. Estas especies marinas se encuentran en ambientes donde prevalecen altas presiones y bajas temperaturas. Se ha sugerido que la síntesis de AGPI es una consecuencia de la adaptación necesaria para contrarrestar el efecto de las adversas condiciones ambientales sobre la fluidez de la membrana (Nichols *et al.*, 1993; 2002).

Dos miembros del género *Shewanella*, que utilizan ácido tánico y derivados como única fuente de carbono, se han aislado de estuarios templados. A temperaturas relativamente altas de crecimiento (24 °C) se ha observado que el contenido de EPA se encuentra en el intervalo de 10 a 23,6% del total de ácidos grasos (Skerratt *et al.*, 2002).

Ya que en términos generales las productividades alcanzadas en cultivos de bacterias son muy bajas para ser consideradas en la producción industrial, la investigación está siendo enfocada hacia el estudio del genoma y bioquímica de las bacterias productoras de AGPI. Un fragmento de genoma de *Shewanella putrefaciens* SCRC-2738 fue clonado en *Escherichia coli* lográndose la producción de EPA. La secuencia de ADN de 38 kbp mostró homología con enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos (Yazawa, 1996). La misma secuencia fue clonada en una cianobacteria *Synechococcus sp* obteniéndose EPA y AA (Yu *et al.*, 2000).

## Microalgas

Las microalgas comprenden un amplio grupo de microorganismos fotosintéticos y heterotróficos que incluye al fitoplancton, fuente primaria en la cadena alimenticia del océano. De las aproximadamente 30.000 especies, sólo un número limitado ha sido estudiado y analizado para la producción de lípidos. El producto obtenido no posee el olor y sabor característicos del aceite de pescado. Los aceites producidos por las microalgas contienen una alta proporción de DHA y EPA, y son más estables a la degradación oxidativa que aquellos obtenidos de otras fuentes (Barclay *et al.*, 1998).

La producción comercial de algas posee algunos obstáculos entre los que se encuentra la necesidad de procesar grandes volúmenes de agua, razón por la cual los costos de cosecha pueden representar hasta el 33% del costo total de producción (Barclay *et al.*, 1994). Además, la producción de biomasa en estanques y piscinas depende de la estación del año. En cultivos de *Porphyridium cruentum*, desarrollados para la producción de EPA, la productividad en biomasa presentó valores de 12 y 24 g (m<sup>3</sup> día)<sup>-1</sup> en los meses de invierno y verano, respectivamente (Cohen *et al.*, 1988).

En cultivos de microalgas fototróficas realizados en fermentadores, para la producción de ácidos grasos, se obtienen bajos rendimientos principalmente debido a que la producción de biomasa es limitada por el suministro de luz y oxígeno (Barbosa, 2003). Martek Biosciences (EE.UU.) ha desarrollado la tecnología para la producción de AGPI a partir de cepas de la diatomea *Nitzschia*, productora de EPA, y del dinoflagelado marino heterotrófico estricto *Cryptheconidium cohnii*, productor de DHA. La concentración celular obtenida en el cultivo de cepas de *Nitzschia alba* en fermentadores es de 45 - 48 g L<sup>-1</sup>, en procesos realizados durante 64 horas. El contenido de aceite en la biomasa puede ser superior al 50% del peso seco. Se han descrito densidades superiores a 40 g L<sup>-1</sup>, en tiempos de fermentación de 60-90 horas, para el cultivo del dinoflagelado. El contenido de aceite en la biomasa se encuentra entre 15 a 30%, del cual el 20 - 35% es DHA (Barclay, 1994).

Estudios realizados con *Cryptheconidium cohnii* muestran que el contenido de lípidos puede ser su-

perior al 20% del peso seco de la biomasa, y la fracción de DHA se encuentra entre 30 y 50% (de Swaaf *et al.*, 1999). Al usar glucosa como fuente de carbono para el crecimiento, los principales ácidos grasos producidos por *C. cohnii* son C16:0 y C22:6 con una productividad de  $19 \text{ mg (L h)}^{-1}$  (Jiang *et al.*, 1999). Otras fuentes de carbono como ácido acético y etanol se han usado en operaciones de fermentación. Se han obtenido productividades de  $45$  y  $53 \text{ mg (L h)}^{-1}$  al usar ácido acético y etanol, respectivamente (de Swaaf *et al.*, 2003; Ratledge *et al.*, 2001). Las nuevas estrategias de cultivo consideran el uso de aireación forzada, ya que se ha comprobado que el proceso de biosíntesis de AGPI requiere oxígeno (Jiang *et al.*, 1999).

La relación carbono : nitrógeno (C : N) es uno de los parámetros importantes en la producción de AGPI por microalgas. En cultivos en los cuales se ha suprimido la fuente de nitrógeno, se ha obtenido un incremento de hasta tres veces en el contenido de ácidos grasos, en conjunto con aumentos en peso y tamaño celular (Roessler, 1990). Este fenómeno se atribuye a la acumulación de sustancias de reserva en condiciones de crecimiento limitado, característica de los microorganismos oleaginosos.

## Hongos

Se han estudiado diversos hongos para la producción de ácidos grasos de cadena larga. Destacan entre éstos aquellos del género *Mortierella*. *Mortierella ramanniana*, *M. Isabellina* y *Mucor circinelloides* son productores de GLA; *M. alpina* y *M. elongata* se caracterizan por ser productores de EPA (Certik y Shimizu, 1999); la cepa *Pythium acanthicum* produce DPA (Gandhi y Weete, 1991). Especies como *Pythium* y *Mortierella* producen AA (Barclay, 1994).

La producción de ácidos grasos a partir de hongos presenta rendimientos de 1 a 2 órdenes de magnitud inferiores a las que se obtienen en los procesos basados en microalgas. Esto se debe a la baja velocidad de crecimiento de los hongos y en algunos casos, a la necesidad de producir algún tipo de estrés en el microorganismo para inducir la síntesis del metabolito deseado.

El sistema de producción utilizado para el cultivo de hongos es en la mayoría de casos la fermentación sólida, la que se caracteriza por bajas velocidades de transferencia de masa y calor (Certik y Shimizu, 1999). Las variables que determinan el crecimiento de hongos en estas operaciones, son la humedad inicial del sustrato sólido, pH, temperatura, tiempo de incubación, suplemento de nitrógeno y de aceite (Bajpai y Bajpai, 1993). En la fermentación sólida de *M. alpina* se han utilizado residuos agroindustriales del arroz, maíz, maní y remolacha tanto en forma individual como sus mezclas; los ácidos grasos producidos son ALA, AA y EPA. Los mejores rendimientos para los tres ácidos grasos fueron obtenidos al utilizar residuos de arroz (Jang *et al.*, 2000).

Ya que las características del producto y rendimiento dependen de las condiciones de cultivo y del sustrato utilizado (Bajpai y Bajpai, 1993; Jang *et al.*, 2000), los estudios se han enfocado principalmente a definir estrategias de fermentación sumergida. El contenido de nitrógeno en el medio de cultivo usado para el crecimiento de hongos afecta la relación entre los ácidos grasos saturados e insaturados. Una alta relación C : N en el medio de cultivo aumenta la concentración de lípidos en la biomasa de *M. ramanniana* (Hansson y Dostalek, 1988). Para esta cepa la incubación a bajas temperaturas también favorece la producción de AGPI e incrementa el grado de insaturación.

## Otras fuentes

El género *Thraustochytrium* fue descrito por primera vez por Sparrow (1936;1943) quien los clasificó en la clase Oomycetes de la División Mastigomycotina entre los hongos (Sparrow, 1973). Posteriormente, los thraustochytridos fueron ubicado en la familia Thraustochytriaceae del orden Thraustochytriales (Dick, 2001). Los géneros en la familia Thraustochytriaceae son *Althornia*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Diplophrys*, *Japonochytrium* y *Elina*.

Estos microorganismos son capaces de acumular la mitad del peso de su cuerpo como AGPI  $\omega 3$ , el que se almacena en las paredes y membranas celulares y constituye material de reserva en forma de triacilgliceroles (Nichols *et al.*, 2002). Se encuentran en todos los ambientes marinos hasta ahora estudiados y pueden representar hasta un 30% de la biomasa presente en una muestra de agua (Raghukumar *et al.*, 2000), por lo que su incidencia en la trama trófica marina es significativa (Hammond *et al.*, 2001). Especies de *Schizochytrium* se han encontrado asociadas a animales marinos, presumiblemente en una relación mutualista o de huésped ya que no hay evidencia de producción de toxinas (Hammond *et al.*, 2001).

Los thraustochytridos se reproducen por medio de zoosporas heterocontas biflageladas, las que se depositan sobre sustratos que ofrecen los nutrientes orgánicos. Morfológicamente pueden diferenciarse por el tamaño de los esporangios, la forma y el número de zoosporas por cada esporangio (Mo y Rinkevich, 2001). Se ha comprobado que la caracterización morfológica es inestable y depende de las condiciones de cultivo (Mo *et al.*, 2002). Actualmente, el gen que codifica la subunidad menor del ARN ribosomal (SSU rADN o 18S rADN) es utilizado para establecer la relación evolutiva y taxonómica de estos microorganismos (Mo y Rinkevich, 2001; Mo *et al.*, 2002).

Diversos estudios han demostrado la capacidad de algunas cepas de thraustochytridos, principalmente los géneros *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*, para producir gran cantidad de biomasa y lípidos con alta proporción de AGPI (Bowles *et al.*, 1999). La máxima concentración de biomasa, con-

tenido de lípidos en la biomasa y concentración de DHA obtenidos por Bowles et al. (1999) fueron de 14 g/L, 78% y 2,17 g/L, respectivamente. La capacidad de producir de DHA por diferentes cepas depende del ambiente desde el cual han sido aisladas. Se ha observado que en cepas aisladas desde ambientes con temperaturas no extremas, el DHA corresponde a casi el 50% del total de ácidos grasos (Bowles et al., 1999). Por otra parte, cepas aisladas desde ambientes subtropicales se caracterizan por una alta producción de biomasa y bajos contenidos de DHA (Bowles et al. 1999).

Estos microorganismos pueden utilizar, para su crecimiento bajo condiciones controladas, un amplio espectro de fuentes de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, maltosa, almidón, glicerol, aceite de oliva y linaza) y nitrógeno [extracto de levadura, licor de maíz, polipeptona, triptona, sulfato de amonio, acetato de amonio, nitrato de amonio, nitrato de sodio y urea (Yokochi et al., 1998)]. Sin embargo, tanto la cantidad de biomasa como el rendimiento de ácidos grasos, especialmente DHA, dependen de la composición del medio de cultivo. Por ejemplo, el uso de residuos del proceso de producción de leche de soja (52% hidratos de carbono, 27% proteínas y 12% lípidos; 47% C y 4,5% N) se corresponde con concentraciones de biomasa (aproximadamente 7,5 g/L) comparables a las obtenidas en medios con glucosa (60 g/L) - extracto de levadura (10 g/L) (Fan et al. 2001). No obstante, el contenido de DHA en la biomasa crecida en el residuo como única fuente de C y N, fue de hasta 2 ordenes de magnitud inferior. Estos resultados parecen indicar que no solo la razón C : N determina la producción de AGPI por distintas cepas de estos microorganismos, sino que también la naturaleza de fuente de carbono es importante. Los mejores rendimientos se han obtenido con fuentes fácilmente metabolizables, como la glucosa (Yokochi et al., 1998).

Distintos géneros de la familia *Thraustochytridae* son capaces de sintetizar carotenoides. La ce-

pa KH105 perteneciente al género *Schizochytrium* acumula cantidades importantes de  $\beta$ -caroteno y xantofilas (canthaxantina y astaxantina). La cepa CHN-1 perteneciente al género *Thraustochytrium* sintetiza principalmente astaxantina (Carmona et al., 2003). La cantidad de carotenoides aumenta con la edad del cultivo y es dependiente del pH, temperatura y factores nutricionales.

En diversas patentes (Barclay, 1992; 1994; 2001; Tanaka et al., 2003) se detalla el cultivo de cepas de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y *Ulkenia* para la producción de alimentos que contienen AGPI  $\omega$ 3 destinados a la acuicultura, elaboración de aditivos para la producción de huevos y formulación de alimentos infantiles, la obtención de DHA y/o DPA.

Una comparación de diferentes alternativas de producción biotecnológica de AGPI  $\omega$ 3 a partir de organismos heterotróficos se muestra en la Tabla 1.

#### 4. CONCLUSIONES

En los últimos años se ha confirmado la importancia de los AGPI  $\omega$ 3 tales como EPA y DHA en la dieta humana y animal. El consumo de DHA contribuye al desarrollo del cerebro infantil y el normal funcionamiento del cerebro adulto; en tanto el EPA interviene en la prevención de enfermedades cardiovasculares y de origen inflamatorio. Actualmente, las principales fuentes de obtención de AGPI  $\omega$ 3 son los aceites de pescado y las microalgas. La producción de AGPI de cadena larga a partir de aceite de pescado presenta algunas desventajas tales como su baja concentración, contenido de vitaminas solubles en aceite que pueden originar problemas de salud y contenidos de AGPI  $\omega$ 6. La variada composición de estos aceites dificulta la recuperación y purificación de DHA u otros ácidos grasos biológicamente importantes. Además, presenta problemas de calidad y estabilidad, y posee ese peculiar sabor y olor. Estas características limi-

Tabla 1  
Concentraciones de biomasa y lípidos obtenidos en fermentaciones de distintos microorganismos.  
X, concentración de biomasa, L, contenido de lípidos en la biomasa,  
AGPI  $\omega$ 3 (%\* porcentaje de  $\omega$ 3 en los ácidos grasos totales, %\*\* en la biomasa, \*\*\* solo DHA),  
t, tiempo de fermentación, P, productividad volumétrica

	X (g L <sup>-1</sup> )	L (%)	AGPI $\omega$ 3		t (día)	P g (L día) <sup>-1</sup>	Referencia
			%*	%**			
<i>Cryptheconidium</i>	3,6	30,0	30,0	9,0	2,5 – 4,0	0,8 – 1,2	Kyle (1992)
<i>Nitzschia</i>	1,1	50,0	4,5	2,3	2,7	0,25	Kyle y Gladue (1991)
<i>Mortierella</i>	23,9	36,3	23,6	5,8	7,0	0,2	Shinmen et al., (1992)
<i>Saprolegnia</i>	8,1	10,1	3,9	0,4	3,0	0,1	Kendrick y Rattledge (1992)
<i>Pythium</i>	-	34,1	6,1	2,1	6,6	-	O'Brien et al., (1993)
<i>Vibrio</i>	-	5,0	10,7	0,5	-	-	Ando et al., (1992) Ringo et al., (1992)
<i>Bacterium</i>	6,3	3,7	16,0	0,7	0,3	0,13	Akimoto et al., (1990)
<i>Thraustochytridos</i>	59,2	70,3	37,3***	-	-	2,9	Yagushi et al., (1997)

tan su uso como fuente de AGPI  $\omega$ 3, principalmente EPA y DHA, para uso farmacológico.

Estudios sobre la estimación de la demanda de aceite de pescado para los próximos años muestran una tendencia creciente, por lo que se estima un déficit de esta materia prima, producto de la disminución de los niveles de captura. Hasta el momento el cultivo de microalgas ha tenido un desarrollo tecnológico significativo, aunque no se ha logrado optimizar los procesos para la producción rentable a gran escala.

Surge por lo tanto la necesidad de identificar fuentes alternativas para la obtención de AGPI  $\omega$ 3 y desarrollar las tecnologías para la producción a gran escala. Se ha sugerido que los microorganismos heterotróficos de la familia Thraustochytriidae podrían constituir una nueva fuente de AGPI  $\omega$ 3. Estos microorganismos son capaces de acumular altos niveles de DHA y EPA. Sin embargo, se requiere disponer de cepas con capacidad de producir cantidades importantes de biomasa, optimizar los procesos de recuperación de las fracciones de aceite de interés, y ajustar las características del producto a las especificaciones de mercado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akimoto M, Ishii T, Yamagaki K, Ohtaguchi K, Koide K, Yazawa K. 1990. Production of eicosapentanoic acid by a bacterium isolated from mackerel intestines. *J Am Oil Chem Soc* **67**, 911-915.
- Ando S, Nakajima K, Hatano M. 1992. Incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipids of a marine bacterium *Vibrio sp.* cultivated with sardine oil. *J Ferm Bioeng* **73**, 169-171.
- Bajpai P, Bajpai, PK. 1993. Eicosapentanoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J Biotechnol* **30**, 161-183.
- Barbosa MJGV. 2003. Microalgal photobioreactors: scale-up and optimization. *Ph.D. Thesis*. Wageningen University. Wageningen. The Netherlands.
- Barclay WR. 1992. Process for the heterotrophic production of microbial oils with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids. US Patent no.5,130,242.
- Barclay WR, Meager KM, Abril, JR. 1994. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J Appl Phycol* **6**, 123-129.
- Barclay WR. 1994. Process for growing *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* using non-chloride salts to produce a micro-floral biomass having omega-3 highly unsaturated fatty acids. US Patent no. 5,340,742.
- Barclay W, Abril R, Abril P, Weaver C, Ashford A. 1998. Production of docosahexaenoic acid microalgae and its benefits for use in animal feeds. *World Rev Nutr Diet* **83**, 61-76.
- Barclay WR. 2001. Eggs containing high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids and methods for producing the same. US Patent no. 20010000151.
- Bowles RD, Hunt AE, Bremer GB, Duchars MG, Eaton RA. 1999. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexanoic acid production. *J Biotechnol* **70**, 193-202.
- Carmona ML, Naganuma T, Yamaoka Y. 2003. Identification by HPLC-MS of carotenoids of the Thraustochytrium CHN-1 Strain Isolated from the Seto Inland Sea. *Bios Biotechnol Biochem* **67**, 884-888.
- Certik M, Shimizu S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J Biosci Bioeng* **87**, 1-14.
- Cohen Z, Vonshak A, Richmond A. 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *J Phycol* **24**, 328-332.
- Dick MW. 2001. Straminipilous fungi. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, Netherlands.
- 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.
- Gandhi SR, Weete JD. 1991. Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*. *J Gen Microbiol* **137**, 1825-1830.
- Hammond BG, Mayhew DA, Naylor MW, Ruecker FA, Mast RW, Sander WJ. 2001. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium sp.* *Reg Tox Pharm* **33**, 192-204.
- Hansson L, Dostalek M. 1988. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of gamma linolenic acid by *Mortierella ramanniana*. *Appl Microbiol Biotechnol* **28**, 240-246.
- Iwamoto H, Sato G. 1986. Production of EPA by freshwater unicellular algae. *J Am Oil Chem Soc* **63**, 434-438.
- Jang HD, Lin YY, Yang SS. 2000. Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpina* by solid substrate. *Bot Bull Acad Sin* **41**, 41-48.
- Jiang Y, Chen F, Liang S. 1999. Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecidium cohnii*. *Process Biochem* **34**, 633-637.
- Kendrick A, Ratledge C. 1992. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **27**, 15-20.
- Kyle DJ. 1992. Microbial oil mixtures and uses thereof. International Patent Application, Patent Cooperation Treaty Publication WO 92/12711.
- Kyle DJ, Gladue RM. 1991. Eicosapentanoic and methods for their production. International Patent Application, Patent Cooperation Treaty Publication WO 91/14427.
- Mataix J. 2002. Los ácidos grasos omega-3. *Mundo Científico* **235**, 46-51.
- Metz JG, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentine R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A, Yazawa K, Knauf V, Browse J. 2001. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* **293**, 291-293.
- Meyer A, Cirpus P, Ott C, Schlecker R, Zähringer U, Heiz E. 2003. Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: biochemical and molecular evidence for the involvement of a  $\Delta$ 4-fatty acyl group desaturase. *Biochem* **42**, 9779-9788.
- Mo C, Rinkevich B. 2001. A simple, reliable, and fast protocol for Thraustochytrid DNA extraction. *Mar Biotechnol* **3**, 100-102.

- Mo C, Douek J, Rinkevich B. 2002. Development of a PCR strategy for thraustochytrid identification based on 18S rDNA sequence. *Mar Biol* **140**, 883-889.
- Nettleton JA. 1993. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development?. *J Am Dietetic Assoc* **93**, 58-64.
- Nichols DS, Nichols PD, McMeekin TA. 1993. Polyunsaturated fatty acids in antarctic bacteria. *Antarct Sci* **5**, 149-160.
- Nichols DS, Sanderson K, Buia A, Van de Kamp J, Holloway P, Bowman JP, Smith M, Cancuso C, Nichols P, Nichols D, McMeekin TA. 2002. Jabour-Green, J. & Haward, M. (Eds). En "Bioprospecting and Biotechnology in Antarctica" in *The Antarctic: Past, Present and Future*. Antarctic CRC Research Report #28. Hobart, 85-103.
- O'Brien DJ, Kurantz MJ, Kwoczak R. 1993. Production of eicosapentanoic acid by filamentous fungus *Phytium irregulare*. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**, 211-214.
- Qiu X. 2003. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4,7,10,13,16,19): two distinct pathways. *Prost Leuk and Es Fat acids* **68**, 181-186.
- Qiu X, Hong HP, Mackenzie SL. 2001. Identification of a  $\Delta 4$  fatty acid desaturase from *Thraustochytrium sp.* involved in biosynthesis of docosahexaenoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *J Biol Chem* **276**, 31561-31566.
- Raghukumar S, Anil AC, Khandeparker L, Patil JS. 2000. Thraustochytrids protists as a component of marine microbial films. *Mar Biol* **136**, 603-609.
- Ratledge C, Kanagachandran K, Anderson AJ, Grantham DJ, Stephenson JC. 2001. Production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Cryptheconidium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *Lipids* **36**, 1241-1246.
- 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.
- Ringo E, Jostensen JP, Olsen RE. 1992. Production of eicosapentanoic acid by freshwater *Vibrio*. *Lipids* **27**, 564-566.
- Roessler PG. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J Phycol* **26**, 393-399.
- Russell NJ, Nichols DS. 1999. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria - a dogma rewritten. *Microbiol* **145**, 767-779.
- Saglik S, Imre S. 2001.  $\omega 3$ -Fatty Acids in some fish species from Turkey. *J Food Sci* **66**, 210-212.
- Salhi M, Izquierdo MS, HernandezCruz CM, González M, FernandezPalacios H. 1994. Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval Gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **124**, 275-282.
- Sayanova OV, Napier JA. 2004. Eicosapentanoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochem* **65**, 147-158.
- Shinmen Y, Kawashima H, Shimizu S, Yamada H. 1992. Concentration of eicosapentanoic acid and docosahexaenoic acid in an arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4, grown with fish oil. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**, 301-304.
- Simopoulos AP. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* **54**, 438-463.
- Sinclair AJ, Murphy KJ, Li D. 2000. Marine lipids: overview, new insights and lipid composition of lyprinol. *Allerg Immunol* **32**, 261-271.
- Sinclair AJ, Abedin L. 2001. The effect of alpha-linolenic acid on retinal function in mammals. Chapter 7, Eds Shahidi F & Finley JW *Omega 3 fatty acids: Chemistry, Nutrition & Health*, 79-90. American Chemical Society Washington, DC.
- Skerratt, J.H., Bowman, J.P., Nichols, P.D. 2002. *Shewanella Olleyana* sp. nov., a marine species isolated from a temperate estuary which produces high levels of polyunsaturated fatty acids. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2102-2106.
- Sparrow FK. 1936. Biological observations on the marine fungi of woods hole waters. *Biol Bull* **70**, 236-263.
- Sparrow FK. 1943. The aquatic Phycomycetes exclusive of the Saprolegniaceae and Pythium. University of Michigan Press, Ann Arbor.
- Sparrow FK. 1973. Mastigomycotina (Zoosporic fungi). En, The fungi, an advanced treatise. Vol IVB, Academic Press, New York.
- Sprecher H. 1996. New Advances in fatty-acid biosynthesis. *Nutrition* **12**, S5-7.
- de Swaaf ME, Rijk TC, Eggink G, Sijtsma L. 1999. Optimization of docosahexaenoic acid production in batch cultivation by *Cryptheconidium cohnii*. *J Biotechnol* **70**, 185-192.
- de Swaaf ME, Pronk JT, Sijtsma L. 2003. Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptheconidium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 40-43.
- Tanaka S, Yaguchi T, Shimizu S, Sogo T, Fujikawa S. 2003. Process for preparing docosahexaenoic acid and docosapentanoic acid with ulkenia. US Patent no. 6,509, 178.
- Uauy R, Peirano P, Hoffmann D, Mena P, Birch D, Birch E. 1996. Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. *Lipids* **31**, 167-176.
- Yaguchi T, Tanaka S, Yokochi T, Nakahara T, Higashihara T. 1997. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium sp.* *J Am Oil Chem Soc* **74**, 1431-1434.
- Yazawa K. 1996. Production of eicosapentanoic acid from marine bacteria. *Lipids* **31** Suppl: S297-300.
- Yokochi TD, Honda T, Higashihara, Nakahara T. 1998. Optimization of docosahexanoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**, 72-76.
- Yu R, Yamada A, Watanabe K, Yazawa K, Takeyama H, Matsunaga T, Kurane R. 2000. Production of eicosapentanoic acid by a recombinant marine cyanobacterium, *Synechococcus sp.* *Lipids* **35**, 1061-1064.

Recibido: Julio 2005  
Aceptado: Mayo 2006