

OBTENCION DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITE DE FRITURA DE SOYA UTILIZANDO CEPAS NATIVAS DE *Thraustochytridos*

PRODUCTION OF BIODIESEL FROM SOYBEAN FRYING OIL USING NATIVE STRAINS OF *Thraustochytrids*

David Silva R.^{1*}, Alba Roa P.², Roberto Quevedo L.³ y Benita Quilodran T.¹

¹ Departamento de Recursos Naturales y Medio Ambiente, Universidad de Los Lagos, Campus Chiquihue, Km. 6 camino Chiquihue s/n, Puerto Montt, Chile.

² Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Recursos Naturales, Universidad de Pamplona, Campus Pamplona, Ciudad Universitaria, Pamplona, Colombia.

³ Departamento de Acuicultura y Recursos Agroalimentarios, Universidad de Los Lagos, Campus Osorno, Av. Fuchslocher 1305, Osorno, Chile.

* Autor para correspondencia E-mail: david.silva2@ulagos.cl

RESUMEN

Los *Thraustochytridos* son protistas marinos heterotróficos clasificados como microorganismos oleaginosos, que utilizan como sustrato glucosa, glicerol, materia orgánica compleja y residuos ricos en carbono para generar metil ésteres ácidos grasos (FAMES). *Thraustochytridos* tienen un potencial uso para producir biodiesel debido a que su biomasa es rica en lípidos. El estudio evaluó tres cepas aisladas de la costa chilena: AS4A1, VALB1 y IQ81. El perfil bioquímico muestra que VALB1 en glicerol produce mayoritariamente ácido palmítico (26%), mientras que IQ81 y AS4A1 presentan altos valores de ácido oleico (38 y 39%). Éstas se cultivaron en glicerol puro (GLI) y glicerol residual (GR) obtenido de la producción de biodiesel de aceite de fritura de soya (BAFS). Los cultivos de las tres cepas generaron FAMES (biodiesel), luego se identificó y cuantificó los ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFAs) y se compararon con el BAFS. El perfil de BAFS arrojó como valor de SFA más MUFA 30,70%. En cuanto a la cepa AS4A1 en GR el valor sumatorio fue 38,14% y una concentración de biomasa de 13,62 g L⁻¹. Para VALB1 los valores fueron de 32,61% en GR y biomasa 6,07 g L⁻¹. En cuanto a IQ81 se obtuvo 49,56% en GR y biomasa de 5,28 g L⁻¹. Los resultados muestran que AS4A1 genera mayor concentración de biomasa y presenta valores similares con el BAFS en contenido de SFA y MUFAs usando GR. Esto indica que este residuo es una potencial alternativa autorregulable de producción de biodiesel y es la primera referencia que se reporta usando aceite de fritura de soya para ser bioconvertido por los *Thraustochytridos*, aprovechando ciclicamente todo el GLI formado.

Palabras clave: biocombustible, metil éster de ácidos grasos (FAMES), microorganismo oleaginoso, transesterificación, metóxido.

ABSTRACT

Thraustochytrids are marine heterotrophic protists classified as oleaginous microorganisms, which use substrate as glucose, glycerol, complex organic matter and carbon-rich residues to generate fatty acid methyl esters (FAMES). *Thraustochytrids* can be potentially used to produce biodiesel because their biomass is rich in lipids. This study evaluated three strains isolated from the Chilean coast: AS4A1, VALB1 and IQ81. The biochemical profile shows that VALB1 in glycerol produces mainly

palmitic acid (26%), whereas IQ81 and AS4A1 have high values of oleic acid (38 and 39%). These were grown in glycerol (GLI) and residual glycerol (GR) obtained from the production of biodiesel from soybean frying oil (BAFS). Cultures of the three strains generated FAMES (biodiesel). Saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFAs) were identified and quantified, and then compared with BAFS. The profile of BAFS was calculated by adding SFA and MUFAs values and resulted in 30.70%. Regarding the AS4A1 strain in GR, this value reached 38.14%, with a biomass concentration of 13.62 g L⁻¹. VALB1 presented values of 32.61% in GR and a biomass 6.07 g L⁻¹, whereas IQ81 recorded values of 49.56% in GR and a biomass concentration of 5.28 g L⁻¹. The results show that AS4A1 generates higher biomass concentration and presents similar values with BAFS in SFA and MUFAs using GR. This indicates that this residue is a potential self-regulating alternative for the production of biodiesel and the first report of the use of soybean frying oil bioconverted by *Thraustochytrids*, cyclically using all GLI formed.

Key words: biofuel, fatty acid methyl esters (FAMES), oleaginous microorganism, transesterification, methoxide.

INTRODUCCIÓN

Los *Thraustochytridos* (TH) son microorganismos pertenecientes al phylum Labyrinthulomycota que se encuentran en diversos ambientes marinos y estuariales. Estos microorganismos se caracterizan por producir altos valores de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) utilizando diversas fuentes de sustrato como glucosa, galactosa, fructosa, manosa, sucrosa (Shene et al., 2010), materia orgánica compleja (Bongiorni et al., 2005), biomasa de celulosa vegetal (Hong et al., 2012) y recientemente residuos de alimentos, como la miga de pan (Thyagarajan et al., 2014).

Los TH han ganado importancia en los últimos 15 años, ya que han generado beneficios aplicables en la biotecnología dado su uso en la obtención y producción de biodiesel y FAMES del tipo omega 3 y 6, particularmente DHA (ácido docosahexaenoico), EPA (ácido eicosapentaenoico) y DPA (ácido docosapentaenoico) (Gupta et al., 2012). Estos son conocidos también por secretar enzimas, polisacáridos, carotenoides, escualeno y coenzimas (Armenta et al., 2006). Una cepa comercial, *Schizochytrium limacinum* SR21, ha sido empleada para producir PUFAs, utilizando GLI derivado del biodiesel y licor de maíz; en otros casos otras cepas han utilizado nutrientes orgánicos provenientes de las aguas residuales de las destilerías, plantas de soya y residuos líquidos de procesos de producción de la cerveza, cáscaras de papa y jugo de sorgo (Zhu et al., 2008; Quilodran et al., 2009; Ethier et al., 2011).

En general, la glucosa ha sido la mayor fuente de carbono utilizada en los procesos fermentativos en los cuales se emplean TH, obteniendo altos rendimientos de biomasa y productividad de lípidos en comparación con otras fuentes de carbono (Burja et al., 2006; Beopoulos et al., 2009;

Gupta et al., 2012). Sin embargo, recientemente el GLI está siendo usado como una fuente alterna de carbono en lugar de la glucosa, debido a que es un compuesto abundante, de menor costo comparado con la glucosa, y que se genera como subproducto en una gran variedad de procesos productivos (Johnson et al., 2007). Justamente en la producción de biodiesel se obtiene GR, el cual puede ser utilizado como fuente de carbono para obtener metabolitos primarios, dando un valor agregado al subproducto obtenido en la refinación del biodiesel (Abad and Turon, 2012).

En este trabajo se analizaron 3 cepas de TH (IQ81, VALB1 y AS4A1) procedentes de diversas regiones y condiciones ambientales de la costa chilena (norte, centro y sur) y se cultivaron en un residuo procedente de la obtención del biodiesel (GR). Se seleccionó la que presentó los mayores valores de biomasa, SFA y MUFAS al bioconvertir el residuo y comprobar que presentaba un perfil de FAMES muy similar con el biodiesel producido a partir de aceite de fritura de soya. Esto permite vislumbrar que existe una alternativa ambiental de aprovechar residuos para generar biocombustible a partir de TH, siendo la primera referencia en la cual se emplea aceite de fritura de soya reciclado para generar GR y ser usado como sustrato en cultivos líquidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Se usó glutamato de sodio (GS) y glucosa (Merck, Germany) como fuente de nitrógeno y carbono en los cultivos; peptona (Oxoid, United Kingdom); extracto de levadura (EL) y agar (Becton, Dickinson and Co., USA) para preparar los medios en placa y ADN polimerasa (Biotools B&M Labs S.A., España) para la elongación de la cadena de ADN. El estándar de ácidos grasos empleado fue Supelco 37 Component FAME Mix,

Varied conc. en diclorometano (Supelco, Sigma-Aldrich, USA). Se usó glicerol puro al 99,9% como sustrato de comparación en todos los cultivos (Sigma-Aldrich, USA). Todas las muestras trabajadas fueron preparadas con agua natural de mar filtrada al vacío por medio de kitasato y usando membranas con tamaño de poro 0,48 μm (Whatman Filters, USA), la cual fue ajustada a un pH 6,8 y salinidad de 29,8 mg L^{-1} .

Aceite de soya comercial y aceite de fritura de soya

Se usó una marca comercial (Aceite Vegetal Bonaza®) de aceite de soya cuya ingrediente es aceite 100% soya, producido por la empresa Argentina Nidera S.A. y exportado a Chile para uso doméstico. La composición de grasas es mayoritariamente del tipo poliinsaturadas, con un valor de 0,556 g mL^{-1} .

El aceite de fritura de soya era de la misma marca comercial y se usa para fritar papas en restaurantes. La cantidad empleada fue 1 L y el mismo aceite se usó 3 veces antes de ser desechado. Se repitió 3 veces el procedimiento, obteniendo como muestra total para los experimentos un volumen de 3 L. En ese punto, se recolectó el aceite, se filtró con embudo de vidrio de vástago corto, \varnothing 140 mm y papel filtro No 1 \varnothing 125 mm (MFS, Japan), se dejó sin ningún tipo de residuo y se procedió a usar para generar biodiesel.

Obtención de biodiesel y GR

Se tomó el aceite de soya de uso comercial y se le añadió NaOH 0,1 M (0,25 g NaOH en 250 mL) con el objeto de calcular el volumen de reactivos a emplear para la metilación. En un vaso de precipitados se tomaron 10 mL de alcohol isopropílico más 1 mL de aceite, a éstos se le añadió 3 gotas de fenolftaleína al 0,5% y se procedió con la titulación. De allí se obtuvieron los gramos de NaOH a emplear en la solución de metóxido a la cual se le añadió metanol (MeOH) (20% del total de la muestra). El NaOH se diluyó con el MeOH obteniéndose al cabo de 1 hora una mezcla de dos capas bien definidas, las cuales se dejaron reposar hasta que se separaran completamente, obteniendo el biodiesel en la parte superior y el GR en el fondo. Para obtener el biodiesel y el GR a partir de aceite de fritura, se utilizó la metodología mencionada anteriormente. La composición de ácidos grasos del aceite de soya comercial y aceite de fritura utilizados, y el perfil de FAMES para biodiesel y GR se muestran en las Tablas 1 y 2 (Miao and Wu, 2010).

Aislamiento de TH

Thraustochytridiace sp. IQ81, VALB1 y AS4A1 fueron aisladas desde agua marina de la costa

chilena de las ciudades de Iquique (norte, latitud 20°13'00" S), Valparaíso (centro, latitud 33°03'47" S) y Puerto Montt (sur, latitud 41°28'18" S). Durante el período de muestreo la salinidad y temperatura del agua en cada punto fue de 35 mg L^{-1} y 20°C en Iquique, 34,4 mg L^{-1} y 16°C en Valparaíso, y 33 mg L^{-1} y 12°C en Puerto Montt. Para el aislamiento se usó el método de polen de pino (Gaertner, 1968; Bremer, 2000) con el cual se obtuvieron buenos aislados para cada cepa. Se tomó 10 mg de polen de pino, se añadió a la muestra de agua (10 mL) y se mantuvo por un período de 7 días a 25°C. Los granos de polen con los microorganismos adheridos se separaron por filtración (filtro de nylon, 20 μm) y se esparcieron sobre una placa Petri con agar B: extracto de levadura (EL) 2 g L^{-1} , peptona (PEP) 2 g L^{-1} y agar 10 g L^{-1} en agua natural de mar filtrada (ANM) preparada a una concentración final de 70% w/v, añadiendo además antibióticos (sulfato de estreptomina y penicilina G, 300 mg L^{-1} , respectivamente, Sigma Aldrich Co., Steinheim, Alemania) para evitar la proliferación de bacterias. Las placas fueron incubadas a 25°C hasta obtener colonias visibles. Luego las colonias individuales fueron subcultivadas de nuevo en placas con agar B hasta obtener aislados puros, los cuales fueron comprobados por inspección en microscopio óptico (Zeiss, Estándar 20, Alemania) (Hinzpeter et al., 2009).

Extracción de ADN e identificación genética

Las células colectadas desde las placas de agar fueron suspendidas en agua destilada (200 μL) y centrifugadas (8000g, 5 min. a 4°C). El precipitado fue resuspendido con buffer de lisis (200 μL ; 0,25 M Tris-Cl; 0,1 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$; 2% p/v SDS; 0,1 M NaCl a pH 8,2). El ADN fue extraído con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitado con etanol. Se amplificaron regiones parciales del gen 18S rRNA por PCR utilizando los cebadores FA1RA1 y FA2RA2 (Mo et al., 2002). El programa cíclico de amplificación (Thermo Electrón Corporation, USA) fue: desnaturalización por 3 min. a 95°C, 35 ciclos de amplificación de 1 min. a 94°C, 1 min. a 50°C y 1 min. a 72°C, con 10 minutos de extensión en la etapa de elongación. Los productos de PCR fueron visualizados sobre un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio y purificados usando un kit de extracción (V-Gene Biotechnology Ltda., Zhejiang, China). Los fragmentos de material genético de las tres cepas de TH fueron secuenciados (ABI-3100, Applied Biosystem, California, USA) y depositados con números de acceso KF718865, KF709393 y FJO10826 y luego fueron comparados con los disponibles en la base de datos de GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA: NCBI página <http://www.ncbi>). La búsqueda de secuencias homo-

Tabla 1. Composición de ácidos grasos totales (TFA) en biodiesel a partir de aceite de soya comercial y aceite de fritura.**Table 1. Composition of total fatty acid (TFA) of biodiesel from soybean cooking oil and frying oil.**

Ácido graso	Aceite comercial	Aceite fritura
	%	
16:0	7,78 ± 1,04	8,42 ± 0,88
18:0	0,60 ± 0,89	1,69 ± 1,47
18:1	18,66 ± 2,66	20,59 ± 2,82
18:2	57,99 ± 3,59	66,68 ± 2,98
18:3	0,64 ± 0,39	1,11 ± 0,20

Datos expresados son medidas de tres réplicas ± desviación estándar para cada experimento ($p \leq 0,05$).

Tabla 2. Composición de ácidos grasos totales (TFA) presentes en el glicerol residual de aceite de soya comercial y aceite de fritura.**Table 2. Composition of total fatty acids (TFA) present in residual glycerol of soybean commercial oil and frying oil.**

Ácido graso	Aceite comercial	Aceite fritura
	%	
16:0	7,56 ± 0,63	8,53 ± 2,88
18:0	2,57 ± 1,09	4,65 ± 1,77
18:1	21,01 ± 2,12	28,30 ± 1,04
18:2	37,53 ± 2,61	43,31 ± 1,69
18:3	2,03 ± 0,98	4,48 ± 1,01

Datos expresados son medidas de tres réplicas ± desviación estándar para cada experimento ($p \leq 0,05$).

logas más cercanas y relacionadas con estos microorganismos, fue realizada usando el programa BLAST disponible en el servidor Web NCBI. Las secuencias determinadas en este trabajo fueron alineadas con otras secuencias del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal 18S rRNA de organismos relacionados, obtenidas desde el Banco de Genes NCBI, utilizando el programa Clustal X (<http://www-igb-mc.u-strasbg.fr/BioInfo/>).

Condiciones de cultivo

El inóculo se preparó transfiriendo células de la placa de agar en 50 mL de medio estéril B2 (para 1 L: glucosa, 10 g, EL, 2 g, GS, 2 g y ANM filtrada a una concentración final de 70% w/v). Se incubaron los matraces por 48 horas a 25°C con agitación orbital a 180 rpm., se midió la densidad óptica a 600 nm comprobando que estuvieran con el valor óptimo (0,4) para iniciar el cultivo. A continuación se inocularon tres matraces (250 mL) que contenían 100 mL de medio de cultivo y se incubaron por un período de 72 h bajo las condiciones ya mencionadas. La concentración de GLI en el cultivo fue de 5 g L⁻¹, utilizándose además

un medio de control (MC). Los experimentos con el GR proveniente del aceite de fritura de soya se realizaron usando la misma concentración de GLI y empleando también un MC. Las soluciones con la fuente de carbono y nitrógeno fueron esterilizadas separadamente (121°C, 15 min.) y mezcladas para obtener la concentración requerida. Después de la esterilización, el pH del medio fue ajustado a 6,8 (con HCl o NaOH). Los resultados corresponden al promedio de experimentos realizados por triplicado. Los datos empleados para realizar la curva de crecimiento se obtuvieron cada 24 h, a partir de los cuales se realizaron todos los análisis.

Biomasa

La biomasa obtenida para cada cepa de TH se separó por centrifugación (6000 g, 15 min a 4°C); el precipitado se lavó tres veces con agua desionizada y se liofilizó, determinándose gravimétricamente la concentración de biomasa en peso seco. Las muestras se almacenaron a 20°C para extraer luego los FAMES. Los resultados corresponden al promedio de experimentos realizados por triplicado.

Perfil de ácidos grasos

Muestras de biomasa liofilizada (30 a 50 mg) fueron empleadas para obtener los FAMES utilizando la técnica de extracción seguida por transesterificación directa (Lewis et al., 2000). Los FAMES extraídos en hexano fueron separados por centrifugación (1000g y 4°C) y analizados en un cromatógrafo de gases (Agilent, 7609, Santa Clara, USA) equipado con columna capilar DB-23 (Agilent J&W GC Column, Serial No USA537135H, USA, Stationary Phase Durabond 23, description 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, temperature limits 40°C to 250°C (260°C Pgm)). La temperatura de la columna fue programada desde 50°C hasta 260°C con una velocidad de incremento de 10°C min⁻¹. El detector de ionización de llama fue FID con gas helio como transportador (200°C). El inyector se mantuvo a 250°C y el volumen de inyección fue 1 μ L. Los picos de los FAMES fueron identificados y cuantificados utilizando estándar de ácidos grasos (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). De igual forma se empleó como estándar interno, metil ester ácido tricosiánico, C23:0 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) (Lepage and Roy, 1986). Se tomó en consideración para cada cepa de TH los SFA y MUFAs y se comparó con los resultados obtenidos para el biodiesel, analizando cual presentó mayor similitud con el biocombustible.

Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas se identificaron mediante una prueba de comparación entre las medias, con un nivel de significación del 5% ($p \leq 0,05$). Antes de realizar ANOVA se comprobó la correlación estadística de cada uno de los datos a analizar. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el software SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). Los resultados fueron expresados como medias \pm SD para cada experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biodiesel y GR

Para el BAFS (Tabla 1) se aprecia que el perfil de FAMES arroja un porcentaje mayoritario para el ácido linoleico (18:2) con un 66,68%, lo que se condice con la composición porcentual que tiene el aceite de fritura de soya, en donde los valores de los PUFAs son los más representativos (mayores al 50%) (Navarro, 2014). También se puede apreciar un alto valor de los MUFAs, específicamente el ácido oleico (18:1), que representa un 20,59% de los ácidos grasos totales. El ácido pal-

mítico (16:0) fue el que presentó mayores valores dentro de los SFA, aportando con un 8,42%. El biodiesel generado a partir de aceite de soya de una marca comercial presentó valores en el perfil de ácidos grasos de 7,78% para el ácido palmítico, 18,66% para el oleico y 57,99% para el linoleico.

El biodiesel producido, sea de aceite de soya comercial o aceite de fritura, presenta una caracterización de ácidos grasos muy similar en su composición general. Las diferencias se aprecian al analizar los porcentajes de los ácidos presentes en mayor cantidad. En este sentido se puede decir, que el ácido linoleico aumenta un 15% en el BAFS, como consecuencia del proceso de fritura. Esto se explica por la acción del oxígeno del aire sobre los ácidos grasos (principalmente los PUFAs) y por la reacción química que se produce entre el agua y el aceite, dando como consecuencia un aumento de los ácidos grasos que favorecen la oxidación de éstos (Herrera, 2009). La composición porcentual evaluada para cada biodiesel se muestra en la Tabla 1.

Se realizó perfil de FAMES al GR obtenido del aceite de soya comercial y de fritura, para identificar los SFA, MUFAs y PUFAs que pudieran haber quedado después de la transesterificación. El valor de los SFA para el que procede de aceite de fritura fue 13,18%, siendo el ácido palmítico (16:0) el mayor con un valor de 8,53%. En cuanto a los PUFAs, el valor sumatorio del ácido linoleico y el linolenico (18:3) fue de un 47,79%. En cuanto los MUFAs (18:1), se encontró presente en un 28,30% del total de los FAMES. Para el GR procedente del aceite de soya comercial, los valores fueron, 7,56% para el ácido palmítico, 21,01% para el oleico y 37,53% para el linoleico.

Al comparar el GR procedente de la metilación, se nota que la mayor cantidad de ácidos grasos presentes son el 18:1 y el 18:2, en ambos casos. La presencia de altos valores de MUFAs es deseable para incrementar la estabilidad oxidativa del biodiesel al igual que la estabilidad térmica. La mayor presencia de PUFAs está dada por el tipo de grano del cual procede el aceite (Pyle et al., 2008). En esta caso siendo aceite de soya, se aprecia que la cantidad de éstos es mayoritaria (más del 55%). Siendo así, los TH podrían utilizar los SFA y MUFAs (16:0, 18:0 18:1) como fuente principal para generar biodiesel y además transformar altos valores de ácido linoleico en otros ácidos grasos de cadena más larga, como el EPA y el DHA, que tienen varias aplicaciones hoy día, tales como formulación de leche en polvo para lactantes, suplemento alimenticio en harinas, quesillos, aditivo para mantequillas, néctares, yogures y como producto (cápsulas) que ayuda a reducir problemas cardíacos. Generalmente se asocia la presencia de ácidos grasos en el GR a residuos generados en la

metoxidación de los aceites al obtener biodiesel (Pyle et al., 2008). La Tabla 2 muestra la composición porcentual del GR presente en cada uno de los aceites analizados.

Morfología e identificación genética

Las tres cepas de TH fueron recolectadas de muestras de agua de mar superficial tomadas en el mes de septiembre de 2013. Esta época es la adecuada, dado que la cantidad de microorganismos aumenta significativamente al acercarse la primavera, por presentar mejores condiciones ambientales para el zooplancton (Bremer, 2000).

La identificación filogenética por secuencia 18S rDNA para *Thraustochytridae* sp. AS4A1, VALB1 y IQ81 mostró que son similares a *Ulkenia* sp. (99%), GenBank: FJO10826, *Thraustochytrium kinnei* (98%), GenBank: KF709393 y *Thraustochytrium* sp. (97%), GenBank: KF718865. Morfológicamente se observa en placa colonias pequeñas de color crema, textura dura y forma de zoosporas redondas para AS4A1, colonias medianas de color blanco, textura dura y zoosporas ovoides para VALB1, y para IQ81 colonias pequeñas blancas con zoosporas redondas bien definidas. Las tres cepas se hicieron crecer en GLI, hallando en cada una de ellas la presencia de 16:0 y DHA como ácidos grasos identificadores de este orden (Raghukumar, 2002).

Crecimiento celular en GLI y GR

Las tres cepas crecidas en GLI mostraron bajos valores en la producción de biomasa (por debajo de los 2 g L⁻¹). No obstante, los valores son mayores que los obtenidos con otras fuentes puras de carbono. Por ejemplo, AS4A1 crece más en GLI (1,41 ± 0,01 g L⁻¹) versus crecimiento en glucosa (0,3 ± 0,00 g L⁻¹), maltosa (0,8 ± 0,01 g L⁻¹) y etanol (0,3 ± 0,00 g L⁻¹) según lo reportado por Quilodran et al, 2010. De igual forma, IQ81 crece menos (0,66 ± 0,25 g L⁻¹) cuando se emplea glucosa como fuente prioritaria y en el caso de VALB1 los valores que se obtienen con la misma fuente son similares a los aquí mostrados, 1,45 ± 0,04 g L⁻¹ (Quilodran et al., 2013).

La cepa *Thraustochytrium* sp. AMCQS5-5 aislada y cultivada en Australia a una concentración de 4 g L⁻¹ tanto en glucosa como GLI, reportó un crecimiento celular en GLI de 1,3 g L⁻¹, siendo muy similar a lo encontrado con las cepas aquí estudiadas; sin embargo, los resultados en glucosa mostraron valores superiores a 8 g L⁻¹ (Gupta et al., 2013).

Otro estudio realizado cultivó la cepa *Thraustochytrium* sp. ONC T18 empleando glucosa y GLI juntos con una concentración de 48 g L⁻¹ durante 6 días. Los resultados obtenidos arrojaron como valores de producción de biomasa más de 20 g

L⁻¹ para cada fuente de carbono utilizada. Incluso en los días 5 y 6 en la curva de crecimiento, no se aprecia diferencia significativa en los valores obtenidos (Spencer et al., 2011).

Con base en lo anterior, se puede afirmar que el GLI es una fuente de carbono que puede ser usada en el mismo orden de importancia que la glucosa, ya que los resultados para la producción de biomasa demuestran que no hay diferencia notoria entre uno y otro. El GLI es un agente osmótico (una sustancia que tiene la capacidad de elevar la fuerza osmótica de la solución, y en consecuencia, mantener el equilibrio osmótico de las células), además de ser una fuente de carbono económica para un suministro alto de energía y un soluto compatible para las enzimas y membranas, no teniendo efectos tóxicos aún a concentraciones altas. Siendo así, el GLI puede ser usado como sustrato para incrementar el crecimiento de cultivos heterotróficos, conociendo el metabolismo del microorganismo cuando las condiciones heterotróficas son limitadas (Pérez-García et al., 2011).

El hecho de emplear GLI y GR se apoya en la posibilidad de buscar una fuente alterna de carbono que pueda ser usada para la fermentación en microorganismos con el objeto de generar biocombustibles, reemplazando así la glucosa que es el principal sustrato utilizado actualmente.

Al usar el GR generado en la metilación del aceite de fritura de soja, los resultados muestran que la cepa AS4A1, 99% *Ulkenia* sp., es la que produce mayor cantidad de biomasa a los 7 días. Los valores para AS4A1 indican un crecimiento celular que dobla la producción de biomasa con respecto a las cepas IQ81 y VALB1, debido a que AS4A1 aprovecha de mejor forma los micronutrientes presentes en el GR. Pyle et al. (2008) encontraron altos valores de sodio (12,55 g L⁻¹) en GR obtenido de aceite de soja y obtuvieron 8,1 g L⁻¹ de masa celular con *S. limacinum* SR-21 (ATCC MYA-1381). El GR usado en este estudio proviene también de aceite de soja, y aunque este es de fritura, presenta también alta cantidad de sodio, ya que en el proceso de metilación se añade un 20% de NaOH para generar biodiesel. Con base en esto, se puede afirmar que AS41 genera mayor biomasa en comparación con las otras dos cepas, ya que emplea de forma más eficiente el sodio existente en el GR. De igual manera, cuando se comparan los dos tipos de glicerol utilizados como sustrato para el crecimiento de las tres cepas, se nota en AS4A1 un aumento significativo de más de trece veces en la producción de biomasa al emplear el GR (13,62 g L⁻¹). Quilodrán et al. (2010) hicieron crecer AS4A1 en almidón y obtuvieron 4,9 g L⁻¹. Luego, bajo las mismas condiciones emplearon un residuo líquido proveniente

de la industria de la cerveza ($Mg\ 0,264\ g\ L^{-1}$ y $Fe\ 1,05 \times 10^{-3}\ g\ L^{-1}$) y produjeron $14,5\ g\ L^{-1}$ de biomasa. Estos resultados confirman que efectivamente AS4A1 aumenta el crecimiento celular cuando se utilizan residuos como sustrato, dado que los micronutrientes presentes aportan significativamente al desarrollo del microorganismo. La Fig. 1 muestra los resultados para las tres cepas cultivadas en GLI como en GR.

Efecto del GLI y GR en la composición de los ácidos grasos

Los ácidos grasos seleccionados para comprobar obtención de biodiesel a partir de TH fueron el palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolenico (C18:3), dado que estos mismos también se hallan presentes mayoritariamente en el BAFS. Además de ello, representan los ácidos grasos característicos y más deseables en este tipo de biocombustible, como son los SFA y MUFAs (Chang et al., 2012). Los resultados obtenidos para el perfil de ácidos grasos de las tres cepas se muestran en la Tabla 3.

En GLI *Thraustochytrium* sp. IQ81 presenta más de 76% entre los SFA y MUFAs, destacándose el 18:1 con un 38,15% y el 16:0 con un 25,26% del total de ácidos grasos. *Ulkenia* sp. AS4A1 también mostró un valor por encima del 64% en la sumatoria de los SFA y MUFAs, con un valor de 39,41% para 18:1 y 26,34% para 18:2.

Cabe destacar que *Thraustochytrium kinnei* VALB1 mostró un 35,15% en la composición asociada a otros ácidos grasos diferentes a los obtenidos en este estudio. Análisis de esta cepa han demostrado que mayoritariamente produce PU-

FAs, específicamente EPA y DHA. Al respecto, Quilodrán et al. (2013), halló que esta cepa produce un 25,4% de DHA y 7,1% de EPA cuando utiliza residuo de cerveza y 28,8% y 5,4% cuando emplea glucosa. También, un estudio de Silva et al. (2013), encontró que VALB1 produce 22,35% de DHA y 3,56% de EPA cuando se emplea GLI como fuente de carbono.

Se aprecia que el uso de GLI (99,9% pureza), favorece la producción de SFA y MUFAs en dos de las tres cepas usadas en este estudio: AS4A1 y IQ81, demostrando que existe una buena asimilación por parte de los TH al emplear este sustrato y que por tanto es una opción válida como fuente de carbono pura.

Al analizar los resultados obtenidos con el GR del aceite de fritura de soya se observa para las tres cepas que los porcentajes sumatorios de los SFA y MUFAs no llegan al 50%. Por otro lado, se nota un aumento significativo en la producción de 18:2 para AS4A1 (116,8%) y IQ81 (103,5%), lo cual se debe a la presencia de este ácido graso en el GR del aceite de fritura de soya, ya que es común que queden residuos del proceso de metilación (Pyle et al., 2008).

En el caso de IQ81 se observa que 18:1 se mantuvo estable, ya que el valor en GLI y GR no es estadísticamente significativo (11%). En cambio, al analizar AS4A1 se aprecia una disminución del 36% entre lo producido en GLI y GR para el ácido oleico (18:1). Esto se explica porque al aumentar el 18:2 en GR, AS4A1 utiliza un ácido precursor, como el 18:1, haciendo que disminuya éste ácido graso. Para VALB1 se ve un aumento del 44% en el ácido oleico al usar como sustrato GR. No obs-

Tabla 3. Composición ácidos grasos totales (TFA) para cada cepa de *Thraustochytrido* en glicerol puro (GLI) y glicerol residual (GR).

Table 3. Composition of total fatty acids (TFA) for each strain of *Thraustochytrids* in pure glycerol (GLI) and residual glycerol (GR).

Ácido graso	GLI			GR		
	AS4A1	VALB1	IQ81	AS4A1	VALB1	IQ81
	----- % -----					
16:0	19,18 ± 3,01	26,02 ± 3,77	25,26 ± 2,44	9,08 ± 0,95	10,74 ± 0,61	7,73 ± 1,14
18:0	5,50 ± 1,49	5,45 ± 2,12	12,96 ± 1,84	3,87 ± 1,01	0,57 ± 0,09	7,71 ± 1,59
18:1	39,41 ± 2,91	14,70 ± 3,33	38,15 ± 2,09	25,19 ± 1,36	21,30 ± 1,11	34,12 ± 2,02
18:2	26,34 ± 3,12	11,55 ± 1,63	7,11 ± 1,78	57,13 ± 1,70	49,31 ± 1,09	14,47 ± 2,70
18:3	2,71 ± 0,81	7,13 ± 0,44	4,96 ± 0,99	1,03 ± 0,24	0,82 ± 0,12	1,55 ± 0,97
Total SFA	24,68	31,47	38,22	12,95	11,31	15,44
Total MUFA	39,41	14,70	38,15	25,19	21,30	34,12
(18:2 + 18:3)	29,05	18,68	12,07	58,16	50,13	16,02
Otros	6,86	35,15	11,56	3,70	17,26	34,42

Datos expresados son medidas de tres réplicas ± desviación estándar para cada experimento ($p \leq 0,05$).

GLI = Glicerol; GR = Glicerol Residual

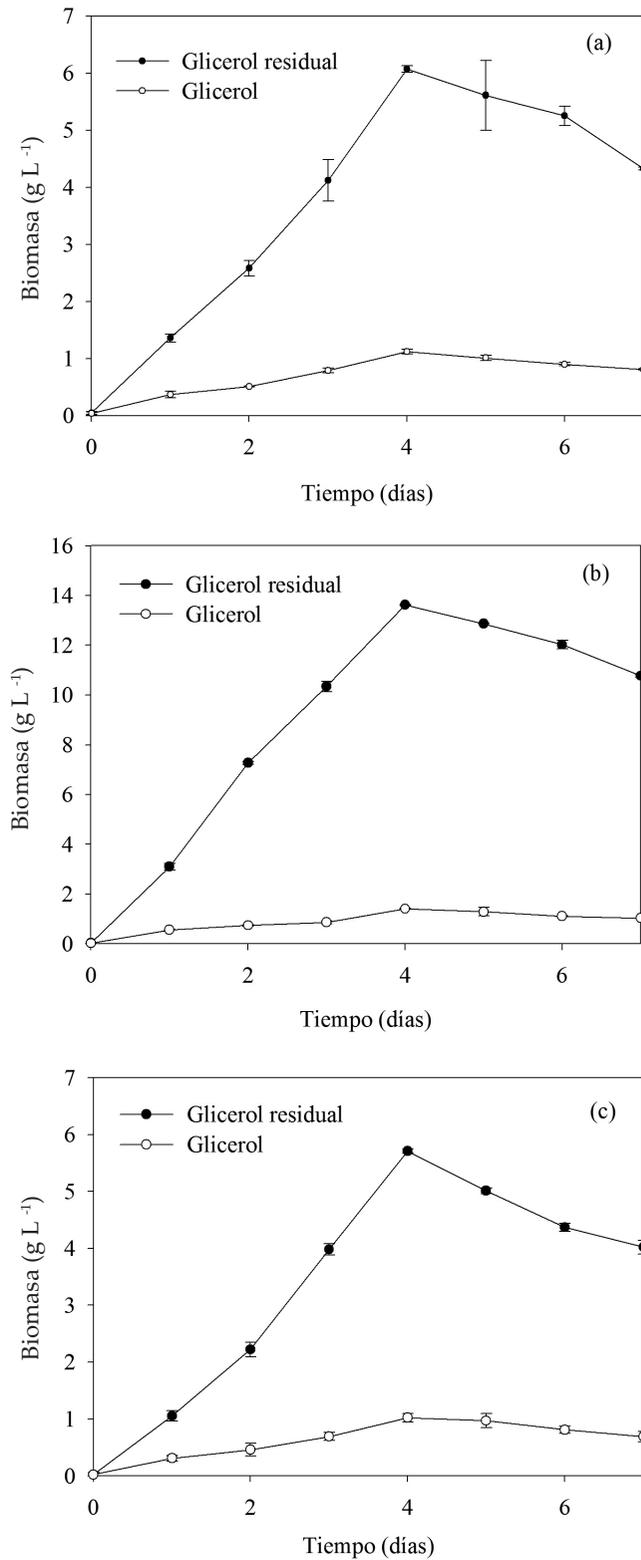


Fig. 1. Crecimiento de biomasa en función del tiempo para las cepas de *Thraustochytridos*: (a) VAL-B1, (b) AS4-A1 y (c) IQ-81.
 Fig. 1. Growth of biomass over time for the strains of *Thraustochytrids* : (a) VAL-B1, (b) AS4-A1 and (c) IQ-81.

tante lo que más sobresale es el aumento del ácido linoleico (más de un 325%), lo que se explica por la alta composición química de dicho ácido graso en el GR. En este caso VALB1 aprovecha al máximo la gran cantidad disponible de 18:2, bioconvirtiéndolo en forma directa para producir la mayor cantidad posible de ácido linoleico.

En el caso de IQ81 se aprecia un aumento de otros ácidos grasos, lo que queda reflejado en el 34,42% que muestra el perfil. Estudios anteriores realizados con IQ81 creciendo en glucosa por Silva et al. (2012), encontraron que esta cepa genera un 6,10% de EPA y 20,2% de DHA. De igual forma Quilodrán et al. (2013) encontraron que al crecer IQ81 en residuo de cerveza, se obtenían valores similares de EPA y DHA, 5,12% y 23,5% respectivamente.

Al realizar una comparación del perfil de ácidos grasos de las tres cepas de TH (Tabla 3) con el perfil del BAFS (Tabla 1) y analizando los cinco ácidos grasos seleccionados, se puede ver que AS4A1 y VALB1 son las que presentan mayor similitud en cuanto a composición porcentual con el biodiesel. Dado que estos ácidos grasos son mayoritarios en el BAFS, se puede decir que efectivamente TH genera biocombustible (biodiesel).

Producción de biodiesel por TH

Las tres cepas de TH producen FAMES (biodiesel), sea que se utilice GLI o GR, no obstante la composición porcentual de los SFA y MUFAs varía de una a otra. Al emplear GLI, se aprecia que AS4A1 produce la mayor cantidad SFA (16:0 y 18:0) de las tres cepas con 15,44 g L⁻¹ y 9,49 g L⁻¹ respectivamente. De igual forma, la mayor presencia de 18:1 está dada en AS4A1 con un valor de 56,41 g L⁻¹, con lo que se puede afirmar, al comparar los datos con la muestra de BAFS, que con esta cepa se podría producir biodiesel con valores incluso superiores a los presentes en la muestra generada a partir del aceite de fritura. Estos resultados se conciden con lo obtenido por Chang et al. (2012) quienes emplearon 8 cepas aisladas en Australia de los géneros *Schizochytrium* y *Thraustochytrium* y obtuvieron en promedio para la suma de SFA y MUFAs un contenido de 44,6% como porcentaje total de ácidos grasos. Con esto, Chang et al. (2012) concluyeron que estas cepas podrían ser empleadas para la producción de biodiesel, ya que los ácidos grasos presentes favorecen mayoritariamente la estabilidad oxidativa del biocombustible. De igual manera, Chi et al. (2007) emplearon una cepa de *Schizochytrium limacinum* creciéndola en GLI y obtuvieron entre SFA (14:0, 16:0 y 18:0) y MUFAs (18:1) valores por encima del 50% como porcentaje de ácidos grasos totales, destacándose en este caso la mayor presencia del ácido palmítico (16:0). Heitz et al. (2011) obtuvie-

ron biodiesel a partir de *Chlorella protothecoides* y encontraron que los ácidos grasos presentes en mayor cantidad correspondían al 16:0 (27%), 16:1 (20%) y 18:1 (43%), cuando se empleó como sustrato GR obtenido del aceite de canola. La Fig. 2 muestra los resultados de producción de los respectivos ácidos grasos analizados para cada cepa usando GLI.

Al hacer análisis de la producción de biodiesel al usar GR proveniente del aceite de fritura de soya, los resultados arrojaron que AS4A1 presenta los más altos valores de producción de 16:0, 18:0 y 18:1. Inclusive supera en más del 50% la producción de los SFA y MUFAs de VALB1. En esta misma línea, se aprecia que al comparar 18:1 de AS4A1 con el biodiesel obtenido del aceite de fritura, hay una diferencia en la concentración de ambos valores de un 23% para este ácido, siendo el menor de las 3 cepas empleadas y el que presenta mayor similitud con el biodiesel obtenido del aceite de fritura (49,68 g L⁻¹ versus 40,18 g L⁻¹). Los resultados para producción de SFA y MUFAs empleando GR se pueden apreciar en la Fig. 2(b).

Llama la atención el hecho de que el ácido linoleico (18:2) se produce en altos valores (96,98 g L⁻¹ para AS4A1 y 105,69 g L⁻¹ para VALB1) estando al mismo nivel que el hallado en el biodiesel generado con aceite de fritura (108,67 g L⁻¹). Esto se explica cuando se analiza la composición química de los ácidos grasos presentes en los aceites cuyo origen es soya. Se aprecia, que tanto en el aceite comercial como en el aceite de fritura, los mayores valores porcentuales corresponden al 18:2. Este hecho es destacable, dado que este ácido graso es un buen antioxidante y por esta razón podría contribuir a la estabilidad oxidativa del biodiesel (Monyem et al., 2000; Knothe, 2007). Por esta razón, cuando los TH metabolizan este ácido graso, se mantienen los altos porcentajes de transformación de los FAMES producidos generando incluso mayores valores cuando se compara el uso de GLI versus GR, tal y como se aprecia para AS4A1 y VALB1 (véase Fig. 2). No obstante, es también de mencionar que la transformación de 18:2 por medio de los TH genera otros PUFAs de mayor cadena carbonada, como el ARA (20:4), el EPA (20:5), DPAn3 (22:5) y DPAn6 (22:6) (Burja et al., 2006).

Otros estudios en los cuales se han empleado compuestos residuales para obtener biodiesel y compuestos lipídicos con alto contenido de ácidos grasos totales a partir de otros microorganismos, son los realizados por Johnson et al. (2009) (*Schizochytrium limacinum* SR21, usando 90 g L⁻¹ de GR y 10 g L⁻¹ de licor de maíz) quién produjo biodiesel; Heitz et al. (2011) (*Nannochloropsis* sp. y *Chlorella protothecoides*, empleando GR obtenido de aceite de canola), obtuvo biodiesel; Spencer et

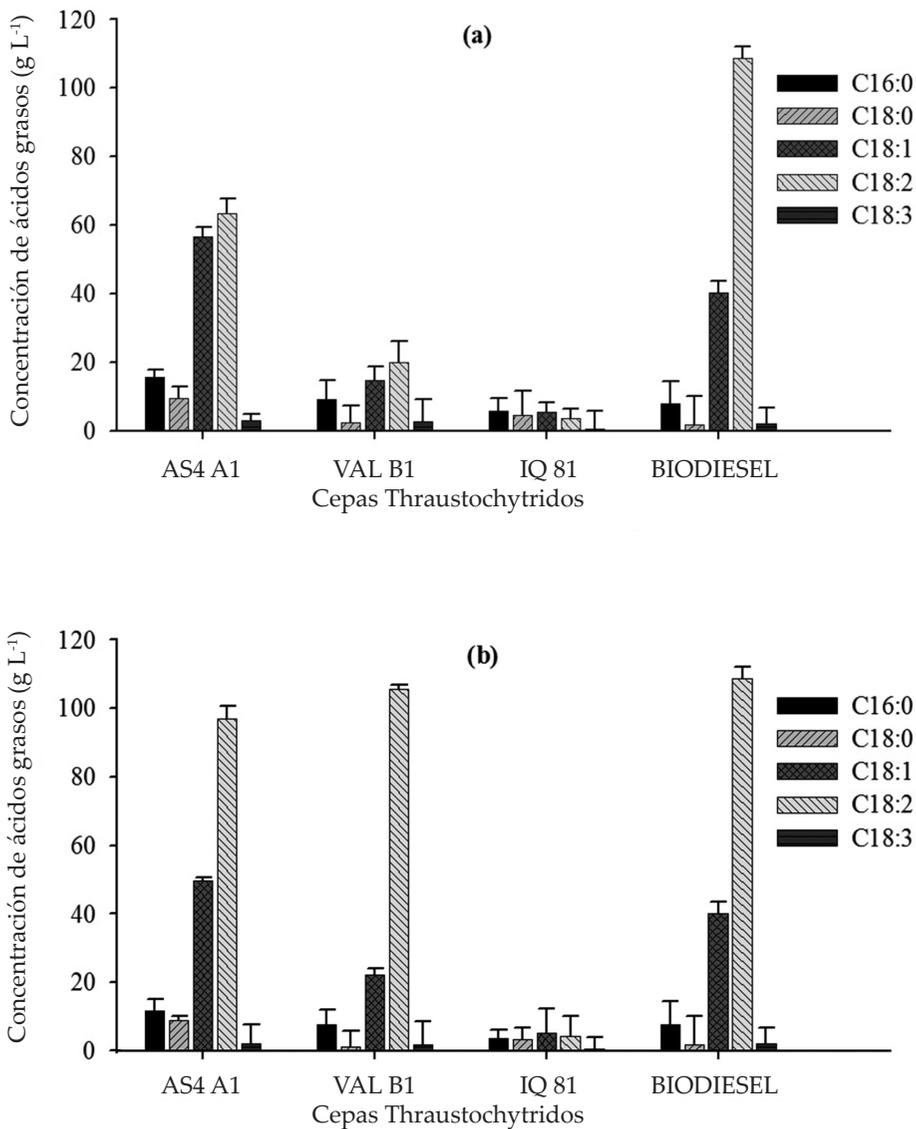


Fig. 2 Producción de ácidos grasos con cepas de *Thraustochytridos* usando a) glicerol puro, y b) glicerol residual.

Fig. 2. Production of fatty acids with strains of *Thraustochytrids* using a) pure glycerol, and b) residual glycerol.

al. (2010) (*Thraustochytrium* sp. *ONC T18*, usando 64,6 g L⁻¹ de GR derivado de la producción de aceite de pescado) produjo biodiesel; Athalye et al. (2009) (*Phytium irregulare*, empleando GR obtenido de aceite de soja) generó altos contenidos de ácidos grasos saturados y monoinsaturados; Narayan et al. (2005) (*Spirulina platenses*, empleando GLI) obtuvo altos valores de ácidos grasos totales y Mu et al. (2006) (con *Klebsiella pneumoniae*), usando GR produjo biodiesel y compuestos lipídicos ricos en ácidos grasos totales. Esto com-

prueba la diversidad de microorganismos que generan contenidos importantes de aceites celulares y su alternativa de uso como biocombustibles.

Al comparar los resultados obtenidos al usar GLI y GR para producir biodiesel, según la composición de SFA, MUFAs y PUFAs, se puede notar que los mejores resultados se obtienen a partir del GR generado en la reacción de metilación con el aceite de fritura de soja tanto para AS4A1 y VALB1. Además, es importante destacar que este estudio es el primero en su género donde se em-

plea aceite de fritura reciclado, lo cual resalta el hecho de poder generar un producto con valor agregado a partir de residuos que llegan a ser contaminante para el medio ambiente.

CONCLUSIONES

Los TH como microorganismos marinos efectivamente pueden producir biodiesel cuando utilizan GR obtenido a partir de la metilación del aceite de fritura de soya. Es destacable este hecho, porque aunque en varias oportunidades se ha empleado GR generado en diversos procesos, esta es la primera referencia que se tiene empleando aceite de fritura reciclado para generar un sustrato (GR) que sea bioconvertido. Las comparaciones realizadas entre el biodiesel obtenido con AS4A1, que fue la cepa con la que se obtuvo los mejores resultados tanto en producción de biomasa (13,62 g L⁻¹) como en producción de 16:0, 11,55 g L⁻¹ y 18:1, 49,68 g L⁻¹, versus el biodiesel obtenido del aceite de fritura (16:0, 7,79 g L⁻¹ y 18:1, 40,18 g L⁻¹), permiten concluir que hay una equivalencia significativa entre ambos biocombustibles.

Queda como trabajo futuro ver la forma de implementar a mayor escala la producción de BAFS empleando TH y analizar la factibilidad económica de producir biocombustible a partir de un aceite que es desechado al alcantarillado de forma indiscriminada en nuestro país.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación de la Universidad de Los Lagos por el financiamiento del Proyecto Interno R01/14, al igual que al Núcleo de Biotecnología Marina Ambiental por el apoyo y asistencia técnica en el desarrollo de la parte experimental.

LITERATURA CITADA

Abad, S., and X. Turon. 2012. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.* 30:733-741.

Armenta, R.E., A. Burja, H. Radianingtyas, and C.J. Barrow. 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.

Athalye, S.K., R.A. García, and Z. Wen. 2009. Use of biodiesel-derived crude glycerol for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregulare*. *J. Agric. Food*

Chem. 57:2739-2744.

Beopoulos, A., J. Cescut, R. Haddouche, J-L. Uribe-larrea, C. Molma-Jouve, and J-M. Nicaud. 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res.* 48:375-387.

Bremer, G. 2000. Isolation and culture of thraustochytrids. p. 49-61. In K.D. Hyde, and S.B. Pointing (eds.) *Marine Mycology – A Practical Approach*. Fungal Diversity Press, Hong Kong, China.

Bongiorni, L., A. Pusceddu, and R. Danovaro. 2005. Enzymatic activities of epiphytic and benthic thraustochytrids involved in organic matter degradation. *Aquat. Microb. Ecol.* 41:299-305.

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

Chi, Z., D. Pyle, Z. Wen, C. Frear, and S. Chen. 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem.* 42:1537-1545.

Ethier, S., K. Woisard, D. Vaughan, and Z. Wen. 2011. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresour. Technol.* 102:88-93.

Gaertner A. 1968. Eine Methode des quantitativen Nachweises niederer mit Pollen köderbarer Pilze im Meerwasser und im Sediment. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh Suppl.* 3:75-92.

Gupta, A., C.J. Barrow, and M. Puri. 2012. Omega-3 biotechnology: thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnol. Adv.* 30:1733-1745.

Gupta, A., D. Singh, C.J. Barrow, and M. Puri. 2013. Exploring potential use of Australian thraustochytrids for the bioconversion of glycerol to omega-3 and carotenoids production. *Biochem. Eng. J.* 78:11-17.

Heitz, M., M. Veillette, M. Chamoumi, and N. Faucheux. 2011. Microalgae-based oil for biodiesel production. *World Academy of Science, Eng. and Technol.* 60:787-790.

Herrera, C.G. 2009. Importancia actual de la oleoquímica en el sector industrial de tensoactivos. *Grasas y Aceites* 60:413-419.

Hinzpeter, I., B. Quilodrán, R. Stead, L. Trujillo, J. Vidal y C. Shene. 2009. Aislamiento de cepas de traustochytridos en la zona costera de Puerto Montt, Chile y evaluación de

- la producción de ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA). Afinidad. Revista de Química Teórica y Aplicada 66:482-487.
- Hong W.K., C.H. Kim, D. Rairakhwada, S. Kim, B.K. Hur, A. Kondo, and J.W. Seo. 2012. Growth of the oleaginous microalga *Aurantochytrium* sp. KRS101 on cellulosic biomass and the production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid. Bioprocess Biosys. Eng. 35:129-133.
- Johnson, M.B., and Z. Wen. 2009. Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. Energy Fuel 23(10):5179-5183.
- Johnson, D.T., and K.A. Taconi. 2007. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. Environ. Prog. 26:338-48.
- Knothe, G. 2007. Some aspects of biodiesel oxidative stability. Fuel Process Technol. 88(7):669-677.
- Lee Chang, K, G. Dunstan, G. Abell, L. Clementson, S. Blackburn, P. Nichols, and A. Koutoulis. 2012. Biodiscovery of new Australian thraustochytrids for production of biodiesel and long-chain omega-3 oils. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93:2215-2231.
- Lepage, G., and C.C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipid in a one step reaction. J. Lipid Res. 27:114-119.
- Lewis T, P. Nichols and T. McMeekin. 2000. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. J. Microbiol. Methods 43(2):107-16.
- Miao, X., and Q. Wu. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresour. Technol. 97:841-846.
- Mo, C., J. Douek, and B. Rinkevich. 2002. Development of a PCR strategy for thraustochytrid identification based on 18S r DNA sequence. Mar. Biol. 140:883-889.
- Monyem, A., M. Canakcy, and J.H. Van Gerpen. 2000. Investigation of biodiesel thermal stability under simulated in-use conditions. Appl. Eng. Agric. 16(4):373-378.
- Mu, Y., H. Teng, D. Zhang, W. Wang, and Z. Xiu. 2006. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. Biotechnol. Lett. 28:1755-1759.
- Narayan, M.S., G.P. Manoj, K. Vatchravelu, N. Bhagyalakshmi, and M. Mahadevaswamy. 2005. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*. Int. J. Food Sci. Nutr. 56:521-528.
- Navarro, C., O. 2014. Obtención de biocombustible a partir de aceites de fritura empleando cepas chilenas de *Thraustochytriaceae*. Tesis pregrado en Ingeniería de Medio Ambiente y Manejo Costero. Universidad de Los Lagos, Puerto Montt, Chile.
- Perez-García, O., F.M. Escalante, L.E. de Bashan, and Y. Bashan. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Water Research 45:11-36.
- Pyle D.J., R.A. García, and Z. Wen. 2008. Producing Docosahexaenoic Acid (DHA)- Rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: Effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. J. Agric. Food Chem. 56:3933-3939.
- Quilodrán B., I. Hinzpeter, A. Quiroz, and C. Shene. 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 Biotechnol. 25:2121-2128.
- Quilodrán, B., I. Hinzpeter, E. Hormazabal, A. Quiroz, and C. Shene. 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. 47:24-30.
- Quilodrán B., I. Hinzpeter, J. Espinoza, A. González, G. Cortínez, y D. Silva. 2013. Producción de biomasa, lípidos totales y ácidos grasos poliinsaturados de Traustochytridios en diferentes medios de cultivos. p. 47. En III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Ambiental y Algal. 7 al 11 abril de 2013, David, Chiriquí, República de Panamá. Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, Panamá.
- Raghukumar, S. 2002. Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). Europ. J. Protistol. 38:127-145.
- Shene, C., A. Leyton, Y. Esparza, L. Flores, B. Quilodrán, I. Hinzpeter, et al. 2010. Microbial oils and fatty acids: Effect of carbon source on docosahexaenoic acid (C22:3 n-3, DHA) production by Thraustochytrid strains. J. Soil Sci. Plant. Nutr. 10:207-216.
- Silva, D., J. Espinoza, I. Hinzpeter, y B. Quilodrán. 2012. Uso potencial de cepas chilenas de traustochytridios para coproducir biodiesel y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). p. 119. En VII Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones. 5 al 8 noviembre de 2012. Instituto de Química de Recursos Naturales, Universidad de Talca, Talca, Chile.

- Silva, D., J. Espinoza, I. Hinzpeter, G. Cortínez y B. Quilodrán. 2013. Obtención de DHA (omega-3) a escala de pruebas, usando una cepa chilena subantártica de *Thraustochytridos*. p. 63. En VI Foro Iberoamericano de Recursos Marinos y Acuicultura (FIRMA). 25 al 28 noviembre de 2013. Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile.
- Spencer D. S., R. Armenta, K.T. Berryman, and A.W. Norman. 2011. Use of raw glycerol to produce oil rich in polyunsaturated fatty acids by a *thraustochytrid*. *Enzyme and Microbial Technol.* 48:267-272.
- Thyagarajan, T. M. Puri, J. Vongsivut, and C.J. Barrow. 2014. Evaluation of bread crumbs as a potential carbon source for the growth of *Thraustochytrid* species for oil and Omega-3 production. *Nutrients* 6:2104-2114.
- Zhu, L., X. Zhang, X. Ren, and Q. Zhu. 2008. Effects of culture conditions on growth and docosahexaenoic acid production from *Schizochytrium limacinum*. *J. Ocean. Univ. China* 7:83-88.