



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO E FORMAÇÃO AVANÇADA

**OPTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO
DOCOSAHEXAENÓICO (DHA, 22:6 ω 3) POR VIA
FERMENTATIVA COM MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS**

Ana Cristina Mateus Mendes

(Licenciada)

**Dissertação apresentada à Universidade de Évora para a obtenção do
Grau de Doutor em Bioquímica**



Orientador: Doutor Alberto José Delgado Reis

Co-orientador: Doutor José Maria Santos Arteiro

Dezembro 2009

Agradecimentos

Ao Doutor Alberto José Delgado dos Reis pela orientação, pelo entusiasmo e convicção neste projecto e na minha capacidade para o por em prática, pela disponibilidade, pela amizade e pela paciência.

Ao Professor Doutor José Maria Santos Arteiro por viabilizar este projecto ao estabelecer a parceria entre a Universidade de Évora e o INETI.

À Doutora Teresa Lopes da Silva pelo incentivo, pela colaboração, pela disponibilidade e pela amizade.

Ao Doutor Carlos Roseiro por viabilizar este projecto (como director do Departamento Biotecnologia), pelo interesse que sempre demonstrou pelo meu trabalho, pelas sugestões e por algumas referências bibliográficas.

Ao Professor Doutor Neto Vaz pelo incentivo e por acreditar no meu trabalho.

Ao Pedro, à Vânia, ao Victor, à Nádia, à Elina, à Rita, ao Rodrigo e ao Francisco Ruano pela colaboração, entusiasmo, companheirismo e amizade.

À equipa da Unidade Piloto, por me receberem e ajudarem quando “gritava por socorro”; ao João por dividir comigo o “gabinete” e pela ajuda quando era preciso “trabalho braçal”.

Ao Dr. Luís Duarte e ao Doutor Francisco Gírio pela cedência da polpa de alfarroba e à doutora Helena Albergaria pelas análises de HPLC.

À Doutora Fernanda Rosa, à Engenheira Helena Maria, à Engenheira Helena Nogueira, à Doutora Paula Passarinho, à Doutora Cristina Oliveira, à Manuela Tomé, à Lurdes Bartolomeu e à Graça pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pela cedência de material, pela ajuda e pela amizade.

Ao Doutor Rui Leiria Mendes pelos ensinamentos e pela colaboração no âmbito da sua especialidade (extracção supercrítica).

Ao Doutor Pablo, à Doutora Ana Lança e à Doutora Eugénia Marques, pela disponibilidade e ajuda.

Aos meus pais, pela confiança nas minhas capacidades e pelo estímulo constante.

Aos meus amigos, em especial à Xana, à Sofia e à Carmo por me ouvirem e incentivarem.

OPTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA, 22:6- ω 3) POR VIA FERMENTATIVA COM MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS

Resumo

Testou-se o xarope de alfarroba como fonte de carbono alternativa quer para crescimento quer para produção de DHA pela microalga heterotrófica marinha *Cryptocodinium cohnii*. Numa fermentação em *fed-batch*, utilizando xarope de alfarroba diluído, suplementado com extracto de levedura e sal do mar, as produtividades em biomassa e em DHA foram 420 mg/Lh e 18,5 mg/Lh, respectivamente, após 100,4 h.

Investigou-se o efeito da adição de *n*-dodecano como vector de oxigénio, no crescimento e na produção de DHA por *Cryptocodinium cohnii*. Após 86,7 h de fermentação, a concentração de biomassa, a taxa específica de crescimento, os teores de DHA e de ácidos gordos totais foram superiores na fermentação contendo 1% (v/v) de *n*-dodecano, comparativamente à fermentação de controlo.

Foi desenvolvido um procedimento simples e pouco dispendioso que envolve a saponificação e metilação da biomassa húmida, seguidas de *winterização* e complexação com ureia, de forma sequencial, para concentrar o DHA extraído da biomassa. A fracção mais pura em DHA (99,2 % do total de ácidos gordos) foi obtida para uma razão ureia/ácidos gordos de 3,5 (m/m), às temperaturas de cristalização de 4 e 8 °C.

OPTIMIZATION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA, 22:6- ω 3) PRODUCTION USING ALTERNATIVE CULTURE MEDIA

Abstract

Carob pulp syrup was tested as an alternative carbon source for either the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii* growth or DHA production. In a fed-batch fermentation using diluted carob pulp supplemented with yeast extract and sea salt, biomass and DHA productivity were 420 mg/lh and 18.5 mg/lh, respectively after 100.4 h.

The effect of *n*-dodecane as an oxygen vector on *Cryptocodinium cohnii* growth and DHA production was investigated. After 86.7 h of fermentation, biomass concentration, specific growth rate, DHA and total fatty acid production were higher in the 1 % (v/v) *n*-dodecane fermentation, compared to control fermentation.

A simple and inexpensive procedure involving saponification and methylation over wet biomass, winterization and urea complexation in a sequential way has been developed in order to concentrate DHA from algal biomass. The purest DHA fraction (99.2% of total fatty acids) was found at the urea/fatty acid ratio of 3.5 (w/w) at the crystallization temperatures of 4 and 8 °C.

Palavras-chave

Ácido docosahexaenóico

Ácidos gordos poli-insaturados

Cryptocodinium cohnii

Xarope de alfarroba

n-dodecano

Winterização

Complexação com ureia

Keywords

Docosahexaenoic acid

Polyunsaturated fatty acids

Cryptocodinium cohnii

Carob pulp syrup

n-dodecane

Winterization

Urea complexation

Abreviaturas

Σ MUFAs – *Sum of monounsaturated fatty acids* (Soma da % relativa do total de ácidos gordos mono-insaturados)

Σ PUFAs – *Sum of polyunsaturated fatty acids* (Soma da % relativa do total de ácidos gordos poli-insaturados)

Σ SFAs – *Sum of saturated fatty acids* (Soma da % relativa do total de ácidos gordos saturados)

a - *interfacial area* (área interfacial)

AA – *Arachidonic Acid* (ácido araquidónico)

AC – *Ammonium chloride* (cloreto de amónio)

ACP – *Acil Carrier Protein* (proteína transportadora dos grupos acilo)

AFDM – *Ash Free Dry Mass* (biomassa livre de cinzas)

AI – *Adequate Intakes* (ingestão adequada)

ALA – α – *Linolenic Acid* (ácido α – linolénico)

ANOVA – *Analysis of Variance* (análise de variância)

ARASCO – *Araquidonic Acid Single Cell Oil* (ácido araquidónico de origem microbiana)

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – *Adenosine triphosphate* (adenosina trifosfato)

BHA – *Butylated Hydroxyanisole* (hidroxianisol butilado)

BHT – *Butylated Hydroxytoluene* (di-ter-butilhidroxitolueno)

BNF – *British Nutrition Foundation*

C – Concentração de oxigénio dissolvido na fase aquosa ([=] oxigénio por unidade de volume de cultura)

C* – Concentração de oxigénio dissolvido em equilíbrio com a fase aquosa ([=] oxigénio por unidade de volume de cultura)

C. cohnii – *Cryptocodinium cohnii*

CBG – *Carob Bean Gum* (goma de semente de alfarroba)

CCMP – *Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton*

CF – *Control batch fermentation without n-dodecane* (fermentação de controlo sem *n*-dodecano)

CoA – Coenzima-A

COX – *Cyclooxygenase* (ciclooxigenase)

CPS – *Carob pulp syrup* (xarope de alfarroba)

CSTR – *Continuous Stirred Tank Reactor* (tanque com agitação contínua)

DCM – *Dry cell mass* (biomassa seca)

DF – *Batch fermentation with n-dodecane 1% (v/v)* (fermentação descontínua com *n*-dodecano 1% v/v)

DH – *Dehydratase* (Desidratase)

DHA – *Docosahexaenoic Acid* (ácido docosahexaenóico)

DHASCO – *Docosahexaenoic Acid Single Cell Oil* (ácido docosahexaenóico de origem microbiana)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (ácido desoxiribonucleico)

DOT – *Dissolved oxygen tension* (tensão de oxigénio dissolvido)

DPA – *Docosapentaenoic Acid* (ácido docosapentaenóico)

DPM – *Dynamic Pressure Method* (método da pressão dinâmica)

DRI – *Dietary Reference Intakes* (dose diária recomendada)

E – *episome* (epissoma)

EPA – *Eicosapentaenoic Acid* (ácido eicosapentaenóico)

EPS – *Extracellular polysaccharides* (polissacáridos extracelulares)

ER- *Enoyl reductase* (enoil redutase)

ESPGAN – *European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*

FA – *Fatty Acids* (ácidos gordos)

FACES – *Fatty Acid Chain Elongation System* (sistema de alongação de cadeia de ácidos gordos)

FADH₂ – *Flavin Adenine Dinucleotide, reduced form* (dinucleótido de flavina e adenina, forma reduzida)

FAS – *Fatty Acid Synthetase* (sintetase de ácidos gordos)

FFA – *Free Fatty Acids* (ácidos gordos livres)

GC – *Gas Chromatography* (cromatografia gás-liquido)

GLA – γ – *Linolenic Acid* (ácido γ – linolénico)

GMP – *Good Manufacture Prattice* (boas práticas de fabrico)

GRAS – *Generally Recognised as Safe* (reconhecida como segura)

H – *hyposome* (hipossoma)

HETE – *Hidroxy-eicosatetraenoic acids* (ácidos hidroxieicosatetraenóicos)

HNF-4 – *Hepatic Nuclear Factor-4* (factor nuclear hepático4)

HPETE – *Hydroperoxyeicosatetraenoic acids* (ácidos hidroxiperoxeicosatetraenóicos)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

IL – *Interleukin* (interleucina)

ISSFAL – *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

KCR – *β -ketoacyl CoA reductase* (β -cetoacil CoA redutase)

KCS – *β -ketoacyl CoA synthase* (β -cetoacil CoA sintetase)

K_L – *Liquid film mass transfer coefficient* (coeficiente de transferência de massa no filme líquido)

K_{La} – *Gas-liquid mass transfer coefficient* (coeficiente de transferência de massa gás-líquido) ([=]tempo⁻¹)

KR – *Ketoreductase* (ceto-redutase)

KS – *Ketosynthase* (ceto-sintetase)

LA – *Linoleic Acid* (ácido linoleico)

LBG – *Locust bean gum* (goma de semente de alfarroba)

LF – *longitudinal flagellum* (flagelo longitudinal)

LOX – *Lipoxygenase* (lipooxigenase)

LT – *Leukotrienes* (leucotrienos)

LT B4 – *Leukotriene* (leucotrieno B4)

LXRs – *Liver X Receptors* (receptores X do fígado)

m/m – massa por massa

MT – *Malonyl Transferase* (malonil transferase)

NADPH – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, reduced form* (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida)

NF κ B – *Nuclear Factor Kappa B* (factor nuclear kappa B)

\emptyset – *volumetric fraction of oxygen vector* (fracção volumétrica de vector de oxigénio)

OGMs – Organismos Geneticamente Manipulados

OTR – *Oxygen transfer rate* (taxa de transferência de oxigénio) ([=] massa de oxigénio transferida por unidade de volume de cultura e por unidade de tempo)

OUR – *Oxygen uptake rate* (taxa de consumo de oxigénio) ([=] massa de oxigénio consumida por unidade de volume de cultura e por unidade de tempo)

PC – *Phosphatidylcholine* (fosfatidilcolina)

PCBs – *Polychlorobiphenyls* (bifenóis policlorados)

P_{DHA} – *Produtividade volumétrica em DHA* ([=] variação massa DHA por unidade de volume de cultura e por tempo)

PE – *Phosphatidylethanolamine* (fosfatidiletanolamina)

PG – *Prostaglandins* (prostaglandinas)

PKS – *Polyketide Synthase-like* (semelhante à sintase de policétidos)

PL – *Phospholipids* (fosfolípidos)

PLA2 – *Phospholipases A2* (fosfolipases A2)

PPAR – *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* (receptores activados por proliferação celular)

PUFAs – *Polyunsaturated Fatty Acids* (ácidos gordos poli-insaturados)

qO₂ – taxa específica de consumo de oxigénio ([=] oxigénio consumido por massa de células e por unidade de tempo)

r_{DHA} – *Docosahexaenoic Acid production volumetric rate* (produtividade volumétrica de DHA) ([=] variação da massa de DHA por unidade de volume de cultura e por unidade de tempo)

rpm – *Rotations per minute* (rotações por minuto)

r_{TFA} – *Total fatty acids production volumetric rate* (produtividade volumétrica de ácidos gordos) ([=] variação da massa do total de ácidos gordos por unidade de volume de cultura e por unidade de tempo)

r_X – *Biomass production volumetric rate* (produtividade volumétrica de biomassa) ([=] variação da massa de células por unidade de volume de cultura e por unidade de tempo)

SA – *Stearidonic Acid* (ácido estearidónico, 18:4 ω -3)

SCO – *Single Cell Oil* (óleo de origem microbiana)

SEM – *Scan Electron Microscopy* (microscopia electrónica de varrimento)

SF – *Supercritical Fluid* (fluido supercrítico)

SFAs – *Saturated Fatty Acids* (ácidos gordos saturados)

SFE – *Supercritical Fluid Extraction* (extração com fluidos supercríticos)

SREBPs – *alpha and Sterol Regulatory Element Biding Proteins* (proteínas de ligação de elementos reguladores alfa e esterol)

STD – *Satandard deviation* (desvio padrão)

TAG – *Triacilglicerols* (triacilgliceróis)

TBHQ – *Tertiary Butylhydroquinone* (butil hidroquinona terciária)

TBX – *Thromboxanes* (tromboxanos)

TF – *transverse flagellum* (flagelo transversal)

t – tempo

t_d – tempo de duplicação ([=]tempo)

TFA – *Total Fatty Acids* (total dos ácidos gordos)

THA – *Tetracosahexaenoic Acid* (ácido tetracosahexaenóico)

TNF – *Tumor necrosis factor* (factor de necrose tumoral)

U/FA – *Urea/Fatty Acids Ratio* (w/w), razão mássica ureia/ácidos gordos

UTEX – *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin*

UV – ultravioleta

v/v – volume por volume

VLCPUFAs – *Very-Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids* (ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa)

vvm – *Volume of gas per volume of aerated liquid per minute* (volume de gás por volume de líquido arejado por minuto)

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

X – Concentração de células ([=] massa de células por unidade de volume de cultura)

YE – *Yeast Extract* (Extracto de levedura)

μ_{max} – *maximum specific growth rate* (taxa específica máxima de crescimento) ([=]tempo⁻¹)

ω -3 – omega 3

ω -6 – omega 6

Índice

| | |
|--|----------|
| Agradecimentos..... | i |
| Resumo..... | iii |
| Abstract..... | v |
| Palavras chave/ Keywords..... | vii |
| Abreviaturas..... | ix |
| Índice..... | xv |
| Índice de figuras..... | xix |
| Índice de tabelas..... | xxiii |
| | |
| Capítulo 1 – Introdução..... | 1 |
| | |
| Capítulo 2 – Revisão da literatura..... | 7 |
| 2.1 Ácidos gordos..... | 9 |
| 2.2 Ácidos gordos poli-insaturados..... | 13 |
| 2.2.1 Biossíntese..... | 14 |
| 2.2.2 Funções e metabolismo..... | 28 |
| 2.2.3 Benefícios para a saúde..... | 33 |
| 2.2.4 Nutrição: importância da razão ácidos gordos ω -6/ ω -3..... | 38 |
| 2.3 Produção de ácidos gordos poli-insaturados..... | 43 |
| 2.3.1 Fontes não microbianas..... | 43 |
| 2.3.2 Fontes microbianas..... | 46 |
| 2.4 Produção de ácidos gordos poli-insaturados por microalgas marinhas..... | 52 |
| 2.4.1 <i>Via</i> autotrófica..... | 52 |
| 2.4.2 <i>Via</i> heterotrófica..... | 53 |
| 2.5 DHA..... | 55 |
| 2.5.1 Funções e aplicações..... | 55 |
| 2.5.2 Processos de produção microbianos..... | 58 |
| 2.5.3 Otimização da produção microbiana de DHA..... | 60 |
| 2.5.3.1 Composição do meio de cultura..... | 61 |
| 2.5.3.1.1 Fontes de carbono..... | 61 |
| 2.5.3.1.2 Fontes de azoto..... | 74 |
| 2.5.3.1.3 Elementos traço e vitaminas..... | 77 |
| 2.5.3.2 Transferência de oxigénio..... | 78 |
| 2.5.3.3 Temperatura..... | 86 |
| 2.5.3.4 pH..... | 90 |
| 2.5.3.5 Salinidade..... | 91 |
| 2.5.3.6 Idade da cultura..... | 94 |
| 2.5.3.7 Intensidade de luz e duração do fotoperíodo..... | 95 |

| | |
|--|-----|
| 2.5.3.8 Técnicas de cultivo | 96 |
| 2.5.4 Estabilização..... | 97 |
| 2.5.5 Mercado..... | 99 |
| 2.6 <i>Cryptocodinium cohnii</i> | 101 |
| 2.6.1 Taxonomia..... | 101 |
| 2.6.2 Morfologia..... | 103 |
| 2.6.3 Habitat..... | 105 |
| 2.6.4 Nutrição..... | 106 |
| 2.6.5 Reprodução..... | 107 |
| 2.6.6 Composição e metabolitos..... | 109 |
| 2.7 Produção de DHA por <i>Cryptocodinium cohnii</i> | 111 |
| 2.8 Purificação e concentração de DHA e outros ácidos gordos poli-insaturados..... | 115 |
| 2.8.1 Recolha da biomassa | 116 |
| 2.8.2 Pré-tratamento e ruptura celular | 117 |
| 2.8.3 Extracção de lípidos/ácidos gordos | 119 |
| 2.8.4 Concentração e purificação | 122 |
| 2.8.4.1 Cristalização a baixa temperatura (winterização)..... | 122 |
| 2.8.4.2 Complexação com ureia | 125 |
| 2.8.4.3 Extracção supercrítica..... | 132 |
| 2.8.4.4 Métodos enzimáticos..... | 137 |
| 2.8.4.5 Métodos cromatográficos | 145 |
| 2.8.4.6 Métodos baseados na solubilidade de sais | 151 |
| 2.8.4.7 Destilação | 152 |
| 2.8.4.8 Separação por iodolactonização..... | 153 |
| 2.9 Referências | 153 |

Chapter 3 – Study of the docosahexaenóico acid production by the heterotrophic microalga

| | |
|--|------------|
| <i>Cryptocodinium cohnii</i> CCMP 316 using carob pulp as promising carbon source | 227 |
| Introduction | 229 |
| Materials and methods..... | 230 |
| Organism | 230 |
| Carob pulp extraction..... | 230 |
| Preliminary experiments | 231 |
| Bioreactor fermentation..... | 231 |
| Dry cell weight measurements | 231 |
| Determination of specific growth rate..... | 231 |
| Methyl ester preparation and analysis | 231 |
| Results and discussion..... | 232 |
| Preliminary experiments..... | 232 |
| Selection of the optimal carob pulp dilution | 232 |

| | |
|--|-----|
| Selection of the best nitrogen source..... | 232 |
| Bioreactor experiments | 233 |
| Conclusions | 234 |
| References | 234 |

Chapter 4 – Effect of *n*-dodecane on *Cryptocodinium cohnii* fermentations and DHA

| | |
|--|-----|
| production | 237 |
| Introduction..... | 239 |
| Materials and methods..... | 240 |
| <i>K_La</i> measurements..... | 240 |
| Oxygen vector | 241 |
| <i>Cryptocodinium cohnii</i> fermentation..... | 241 |
| Growth conditions | 241 |
| Bioreactor experiments..... | 241 |
| Organic phase | 241 |
| Dry cell weight measurements..... | 241 |
| Glucose measurements | 241 |
| Fatty acid analysis | 241 |
| Results and discussion..... | 242 |
| <i>K_La</i> measurements..... | 242 |
| <i>Cryptocodinium cohnii</i> fermentations | 242 |
| Conclusions | 245 |
| References | 246 |

Chapter 5 – DHA concentration and purification from the marine heterotrophic microalga

| | |
|---|-----|
| <i>Cryptocodinium cohnii</i> CCMP 316 by winterization and urea complexation | 249 |
| Introduction | 251 |
| Materials and methods..... | 252 |
| Growth conditions | 252 |
| Saponification and transmetylation | 252 |
| Fatty acid analysis | 252 |
| Winterization..... | 253 |
| Urea complexation | 253 |
| DHA recovery | 253 |
| Results and discussion..... | 253 |
| Conclusions | 256 |
| References..... | 256 |

Chapter 6 – *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review 259 |

| | |
|-------------------|-----|
| Introduction..... | 261 |
|-------------------|-----|

| | |
|--|------------|
| Habitat | 263 |
| Taxonomy..... | 263 |
| Morphology..... | 264 |
| Reproduction | 264 |
| The vegetative cell cycle..... | 264 |
| Sexual development | 265 |
| <i>C. cohnii</i> fatty acid biosynthesis..... | 265 |
| Nutrition | 266 |
| Cultivation..... | 266 |
| Carbon sources | 266 |
| Nitrogen sources and other nutrients..... | 267 |
| Growth | 267 |
| Temperature | 268 |
| Oxygen supply | 268 |
| pH..... | 268 |
| Salinity | 268 |
| Light..... | 269 |
| Composition and metabolites | 269 |
| DHA production..... | 269 |
| Carbon sources | 270 |
| Growth phase | 271 |
| Salinity | 271 |
| Temperature | 271 |
| Biocompatible organic solvents | 271 |
| DHA industrial production and patents..... | 272 |
| Final applications | 272 |
| References | 273 |
| | |
| Capítulo 7 – Conclusões e sugestões para trabalho futuro..... | 277 |
| Conclusões | 279 |
| Sugestões para trabalho futuro | 280 |
| | |
| Anexos..... | 281 |
| Anexo 1 – Alfarroba..... | 283 |
| Anexo 2 – Efeito da temperatura no crescimento e produção de DHA por <i>Cryptocodinium</i> <i>cohnii</i>..... | 289 |
| Anexo 3 – Composição do meio de cultura f/2+NPM | 295 |
| Anexo 4 – Cálculo das concentrações dos ácidos gordos separados por cromatografia gás-líquido..... | 299 |

Índice de figuras

Capítulo 2

| | |
|--|-----|
| Figura 1 – Representação esquemática dos dois isómeros principais do ácido linolénico. (a) ácido 9,12,15-octadecatrienóico e (b) ácido 6,9,12-octadecatrienóico | 10 |
| Figura 2 – Representação esquemática de acilglicéris..... | 11 |
| Figura 3 – Projecção de Fischer de um triacilglicérol | 12 |
| Figura 4 – Reacção de alongação de cadeia de ácidos gordos..... | 17 |
| Figura 5 – Vias biossintéticas dos PUFAs de cadeia longa..... | 19 |
| Figura 6 – Esquema geral para a síntese de PUFAs pelo sistema PKS | 25 |
| Figura 7 – Esquema proposto para a síntese de DHA via sistema PKS, em <i>Schizochytrium</i> sp | 27 |
| Figura 8 – Biossíntese de eicosanóides a partir dos ácidos gordos | 29 |
| Figura 9 – Síntese de eicosanóides a partir dos ácidos gordos ω -3 e ω -6..... | 31 |
| Figura 10 – Mecanismos pelos quais os PUFAs ω -3 exercem os seus efeitos anti-inflamatórios..... | 32 |
| Figura 11 – Representação idealizada do processo de acumulação de lípidos num microrganismo oleaginoso..... | 47 |
| Figura 12 – Representação do ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω -3) | 55 |
| Figura 13 – Fenómenos de transferência de massa que ocorrem durante o transporte de oxigénio da fase gasosa para as células num reactor biológico | 80 |
| Figura 14 – Mecanismos possíveis para a transferência de oxigénio na presença de vectores de oxigénio..... | 83 |
| Figura 15 – Representação esquemática de <i>Cryptocodinium cohnii</i> | 104 |
| Figura 16 – Fotografia de uma espécie de <i>Cryptocodinium</i> obtida por microscopia electrónica | 105 |

| | |
|---|-----|
| Figura 17 – Diagrama dos ciclos celulares sucessivos de <i>Cryptocodinium cohnii</i> ao longo de 24 h..... | 108 |
| Figura 18 – Processo de fermentação utilizado na produção do SCO (DHASCO™) a partir de <i>C. cohnii</i> | 113 |
| Figura 19 – Extracção de triacilgliceróis a partir de <i>C. cohnii</i> para obter o DHASCO™ | 114 |
| Figura 20 – <i>Layout</i> (logística) do processo de refinação do DHASCO™..... | 115 |
| Figura 21 – Formação de cristais de ureia na ausência e na presença de ácidos gordos de cadeia longa | 126 |
| Figura 22 – Diagrama de fases para o dióxido de carbono, mostrando a zona em que o fluido se encontra em condições supercríticas | 132 |
| Figura 23 – Esquema de uma unidade de extracção supercrítica | 134 |
| Figura 24 – Representação esquemática das reacções de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases | 137 |

Chapter 3

| | |
|--|-----|
| Fig. 1 – Effect of the carob pulp syrup dilution on <i>C. cohnii</i> CCMP 316 growth in nephelometer flask. (a) Time course of the biomass concentration at different carob pulp syrup dilutions. (b) Effect of the carob pulp syrup dilution on the maximum specific growth rate | 232 |
| Fig. 2 – <i>C. cohnii</i> CCMP 316 fed-batch fermentation using carob syrup as carbon source supplemented with yeast extract..... | 233 |

Chapter 4

| | |
|--|-----|
| Fig. 1 – Effect of <i>n</i> -dodecane volumetric fraction on the gas-liquid volumetric transfer coefficient K_La for different stirring rates and aeration rates | 242 |
| Fig. 2 –Effect of <i>n</i> -dodecane addition on <i>C. cohnii</i> batch profile fermentation. (a) speed rate, (b) biomass, (c) dissolved oxygen, (d) DHA concentration..... | 243 |

Fig. 3 –Effect of *n*-dodecane addition on *C. cohnii* DHA content of biomass (a), percentage of total fatty acids (b) and DHA productivity (c)..... 244

Fig. 4 – Effect of *n*-dodecane addition on *C. cohnii* TFA content of biomass (a), TFA concentration (b) and TFA productivity (c)..... 244

Chapter 5

Fig. 1 – Scheme for DHA concentration and purification from *C. cohnii* 254

Fig. 2 –DHA percentage of total fatty acids in the non-urea complexing (a) and urea complexing (b) fractions, at different crystallization temperatures and urea/fatty acids ratios..... 255

Fig. 3 –DHA recoveries in the non-urea complexing (a) and urea complexing (b) fractions at different crystallization temperatures and urea/fatty acids ratios 255

Chapter 6

Fig. 1 – Schematic representation of *Cryptocodinium cohnii* cell . A Ventral view. B Dorsal view..... 264

Fig. 2 –Scanning electron micrograph of a *Cryptocodinium* species showing the ventral view 265

Fig. 3 – Diagram of successive cell cycles of a dinoflagellate microalga over 24 h 265

Anexos

Figura A1.1 – Distribuição geográfica mundial da alfarroba 283

Figura A1.2 – Estrutura molecular de três galactomananas: goma de semente de alfarroba, goma de tara e goma de guar 285

Figura A2.1 – Efeito da temperatura no crescimento de *C. cohnii* CCMP 316..... 289

Figura A2.2 – Efeito da temperatura na taxa específica de crescimento de *C. cohnii* a crescer em meio f/2 + NPM suplementado com glucose (3,8 gL⁻¹)..... 290

Índice de tabelas

Capítulo 2

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 – Alguns ácidos gordos que ocorrem na natureza..... | 11 |
| Tabela 2 – Principais reacções de síntese de ácidos gordos em bactérias | 15 |
| Tabela 3 – Origem dos genes disponíveis para codificar cDNAs dessaturases e elongases envolvidas na biossíntese de LCPUFAs..... | 21 |
| Tabela 4 – Ingestão adequada recomendada de ácidos gordos ω -3 | 40 |
| Tabela 5 – Ingestão adequada de diferentes ácidos gordos, recomendada para adultos | 41 |
| Tabela 6 – Ingestão adequada de diferentes ácidos gordos, recomendada para alimentação/formulações infantis..... | 41 |
| Tabela 7 – Percentagens de alguns ácidos gordos nos lípidos de alguns microrganismos | 48 |
| Tabela 8 – Perfil de ácidos gordos dos SCO ricos em AA actualmente em produção | 49 |
| Tabela 9 – Perfil de ácidos gordos de alguns óleos microbianos, vegetais e animais..... | 52 |
| Tabela 10 – Perfil de ácidos gordos dos SCO ricos em DHA actualmente em produção..... | 58 |
| Tabela 11 – Classificação de lípidos | 119 |
| Tabela 12 – Concentração de PUFAs em extractos de ácidos gordos e complexos de ureia, obtidos pelo método dos complexos de ureia..... | 131 |
| Tabela 13 – Comparação das condições experimentais e purezas das fracções enriquecidas em PUFAs, obtidas por HPLC..... | 148 |

Chapter 3

| | |
|--|-----|
| Table 1 – Effect of the nitrogen source on the <i>C. cohnii</i> CCMP 316 maximum specific growth..... | 232 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Table 2 – <i>C. cohnii</i> CCMP 316 fatty acid composition at different carob pulp syrup dilutions | 233 |
| Table 3 – Comparison of carob pulp syrup with other carbon sources used for <i>C. cohnii</i> DHA production..... | 234 |
| Table 4 – Fatty acid composition of <i>C. cohnii</i> CCMP 316 grown in a 2-l bioreactor containing diluted carob pulp syrup | 234 |

Chapter 4

| | |
|---|-----|
| Table 1 – Influence of <i>n</i> -dodecane presence on <i>C. cohnii</i> cellular fatty acid composition at different fermentation times | 245 |
|---|-----|

Chapter 5

| | |
|--|-----|
| Table 1 – <i>C. cohnii</i> fatty acid composition (total fatty acids/%) before winterization and in liquid fraction after winterization..... | 254 |
| Table 2 – Fatty acid composition (total fatty acids/%) of both urea complexing and non-urea complexing fraction as a function of the urea/fatty acid ratio and crystallization temperature..... | 255 |

Chapter 6

| | |
|--|-----|
| Table 1 – DHA productivities of <i>Cryptocodinium cohnii</i> on different carbon sources..... | 270 |
|--|-----|

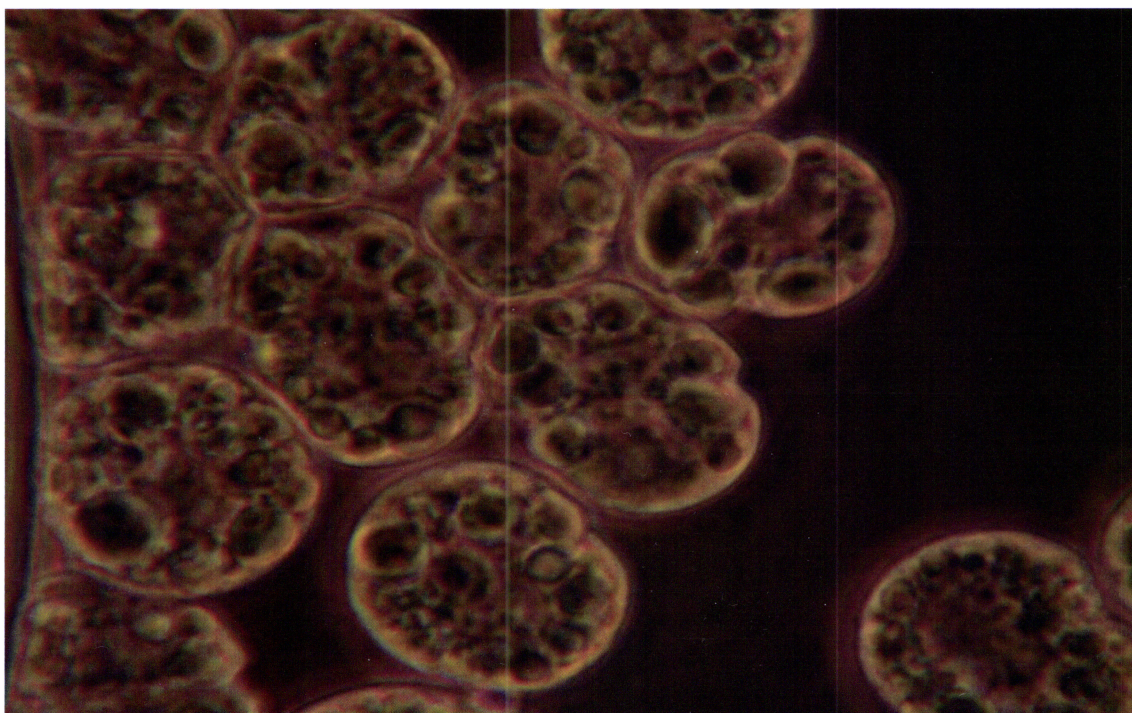
Anexos

| | |
|---|-----|
| Tabela A1-1 – Composição típica média da alfarroba..... | 284 |
| Tabela A2.1 – Efeito da temperatura na taxa específica de crescimento, no tempo de duplicação e na absorvância (540 nm), após 76 horas | 290 |
| Tabela A2.2 – Efeito da temperatura no perfil de ácidos gordos de <i>C. cohnii</i> | 292 |
| Tabela A3.1 – Composição do meio de cultura f/2 | 295 |

| | |
|--|-----|
| Tabela A3.2 – Composição da solução de metais traço f/2 | 295 |
| Tabela A3.3 – Composição da solução de vitaminas f/2 | 296 |
| Tabela A3.4 – Composição da solução orgânica stock..... | 296 |

CAPÍTULO 1

Introdução



Crypthecodinium conorii (Seligo) CCMP 316. Ampliação ($\times 1000$)

Capítulo 1 – Introdução

Introdução

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que alguns ácidos gordos poli-insaturados ω -3 possuem uma influência benéfica na saúde humana (Jiang et al., 1999). Os ácidos gordos ω -3 são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais e desempenham um papel importante na prevenção e tratamento de doenças coronárias, hipertensão, cancro, artrite e outras doenças inflamatórias e do sistema imunitário (Simopoulos, 1991; 1999a; 2000; 2002a). Entre os ácidos gordos poli-insaturados ω -3 destaca-se pela sua importância na saúde e nutrição humanas, o ácido docosahexaenóico (*Docosahexaenoic Acid* – DHA), o ácido gordo mais importante no tecido nervoso, que constitui 15-20% do córtex cerebral (o cérebro de um adulto normal possuiu mais de 20 g de DHA) e 30-60% da retina (Bergé & Barnathan, 2005); é também abundante no tecido muscular cardíaco (Kyle, 1996; Arts et al., 2001; Ward & Singh, 2005); no esperma (Apt & Behrens, 1999; Connor, 2000; Arts et al., 2001; Bergé & Barnathan, 2005) e no leite materno (Horrocks & Yeo, 1999; Huisman et al., 1996; Gil et al., 2003; Ratledge, 2004; Yuhas et al., 2006).

O Homem é incapaz de sintetizar DHA *de novo* e a sua capacidade para sintetizar DHA a partir do seu precursor, o ácido α -linolénico (*α -Linolenic Acid* – ALA), é muito limitada (Gerster, 1998; Apt & Behrens, 1999; Arts et al., 2001; Burdge & Calder, 2005; Burdger, 2006; Williams & Burdge, 2006; DeFilippis & Sperling, 2006). Assim, um aporte adequado de DHA terá de ser obtido através da alimentação. Este aporte é particularmente importante durante o último trimestre da gravidez e nos dois primeiros anos de vida para garantir um desenvolvimento neurológico normal (Apt & Behrens, 1999; Arterburn et al., 2000; McCann & Ames, 2005; Burdge et al., 2006; Williams & Burdge, 2006; Dangour & Uauy, 2008; Duttaroy, 2009).

A fonte tradicional de ácidos gordos poli-insaturados ω -3 e também de DHA é o óleo de peixe (Robles Medina et al., 1998; de Swaaf et al., 1999; Sijtsma & de Swaaf, 2004). Esta fonte apresenta, contudo, alguns inconvenientes: sabor desagradável, cheiro característico a peixe, baixa estabilidade oxidativa (de Swaaf et al., 1999; Bergé & Barnathan, 2005), presença de contaminantes (Bergé & Barnathan, 2005) e de colesterol (Bajpai & Bajpai, 1993; Cohen & Cohen, 1991) e um perfil de ácidos gordos complexo (Robles Medina et al., 1998; Sijtsma & de Swaaf, 2004; Wynn et al., 2005). Além disso,

a produção de ácidos gordos poli-insaturados a partir de óleo de peixe está sujeita a variações sazonais e climáticas, que se podem traduzir em variações na quantidade e na qualidade dos óleos obtidos (Bajpai & Bajpai, 1993; Gill & Valivety, 1997). Acresce que, a natureza limitada das reservas marinhas impõe limites à sua exploração (Gill & Valivety, 1997) e a necessidade de obter óleos com elevado grau de pureza obriga a elevados investimentos e custos de produção (Gill & Valivety, 1997; Sijtsma & de Swaaf, 2004).

Devido às suas aplicações alimentares e farmacêuticas, à expansão da aquacultura (as espécies marinhas de cativeiro necessitam de 0,5-2% (m/m) de ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa na sua alimentação e as espécies de água doce necessitam de 0,5-1,5 % de ácidos gordos poli-insaturados com 18 átomos de carbono (Craig & Helfrich, 2002)) e ao facto da população mundial estar a aumentar (dos cerca de seis biliões actuais para 8,9 biliões em 2050 (Arts et al., 2001)), a procura de ácidos gordos poli-insaturados ω -3 tem vindo a aumentar rapidamente e, num futuro próximo, a sua produção a partir das fontes convencionais não será suficiente para abastecer um mercado em franca expansão.

Assim, no sentido de satisfazer a procura crescente e de contornar as desvantagens resultantes da obtenção de ácidos gordos poli-insaturados ω -3 a partir de óleos de peixe, novas fontes e processos de produção têm vindo a ser desenvolvidos (Barclay et al., 1994; Kyle, 1996; de Swaaf, 2003; Kiy et al., 2005; Barclay et al., 2005). Pensa-se que, pelo menos a curto prazo, a resolução do problema passe pela exploração de fontes microbianas de ácidos gordos poli-insaturados (Ratledge, 2005; Kyle, 2005), as quais se espera venham a constituir uma fonte sustentável dos mesmos.

Sendo as microalgas os produtores primários de ácidos gordos poli-insaturados (Barclay et al., 1994; Sijtsma & de Swaaf, 2004; Barclay et al., 2005; Kiy et al., 2005) estas constituem uma fonte promissora dos mesmos atendendo a que o seu perfil de ácidos gordos é menos complexo que o de óleo de peixe (Wynn et al., 2005); as condições da sua produção podem ser controladas e as espécies podem ser seleccionadas de acordo com o ácido gordo poli-insaturado pretendido (Wynn et al., 2005); estes factores traduzem-se numa vantagem adicional – facilidade de purificação (Robles Medina et al., 1998).

A microalga heterotrófica *Cryptocodinium cohnii* foi identificada como uma fonte com potencial para a produção de DHA (Kyle et al., 1992; Kyle, 1996; Sijtsma & de Swaaf, 2004; Wynn et al., 2005) e para a investigação da biossíntese deste ácido

gordo poli-insaturado (Beach et al., 1974; Henderson et al., 1988; Bell & Henderson, 1990; Henderson & Mackinlay, 1991) devido ao facto de ser única na sua composição em ácidos gordos. Pode acumular quantidades relativamente elevadas de lípidos, correspondendo o DHA a 30-50% do total de ácidos gordos (de Swaaf et al., 1999; de Swaaf, 2003; de Swaaf et al., 2003c) e não apresenta nenhum outro ácido gordo poli-insaturado em concentrações superiores a 1% (Harrington & Holz, 1968; Beach & Holz, 1973; Van Pelt et al., 1999; de Swaaf et al., 1999; Ratledge et al., 2001a; Wynn et al., 2005).

Na produção de produtos por fermentação em grande escala as questões económicas desempenham um papel crucial. No caso de produtos de elevado valor acrescentado e baixo volume de produção, como os produtos farmacêuticos, a qualidade do produto e a oportunidade de mercado sobrepõem-se aos custos de produção (Nielsen et al., 2003a). O principal objectivo é obter o produto com um grau de pureza muito elevado, sabendo à partida que quaisquer alterações ao processo de produção, após a sua implementação, serão complicadas pelo facto de necessitarem de aprovação por parte das autoridades que regulamentam a qualidade dos produtos alimentares e farmacêuticos. Satisfeita esta condição, importa minimizar os custos e produção. Há então que atender a factores como o rendimento, a produtividade e a concentração final de produto, sobretudo o último, já que os custos de purificação muitas vezes ultrapassam 90% dos custos totais de produção (Nielsen et al., 2003a).

No caso de culturas com produtividades relativamente baixas, as estimativas dos custos de produção mostraram que os custos fixos constituem a parcela mais importante dos custos totais por unidade de produto (Sijtsma et al., 1998; de Swaaf et al., 1999; de Swaaf, 2003).

Para que os processos de produção de DHA sejam competitivos em termos económicos é fundamental aumentar a sua produtividade, com conseqüente diminuição da contribuição relativa dos custos fixos e diminuição do custo do produto. Um aumento da produtividade volumétrica de DHA pode ser conseguido satisfazendo uma ou mais das seguintes condições: aumento da concentração final em biomassa, aumento do teor em lípidos, aumento do teor em DHA nos lípidos, ou diminuição do tempo total de produção.

Outra abordagem de diminuição dos custos fixos assenta na utilização de substratos alternativos, de baixo custo, na elaboração dos meios de cultura, convertendo resíduos ou sub-produtos da indústria agro-alimentar em produtos de elevado valor

acrescentado por obtenção de óleos a partir de células microbianas (*Single Cell Oil - SCO*).

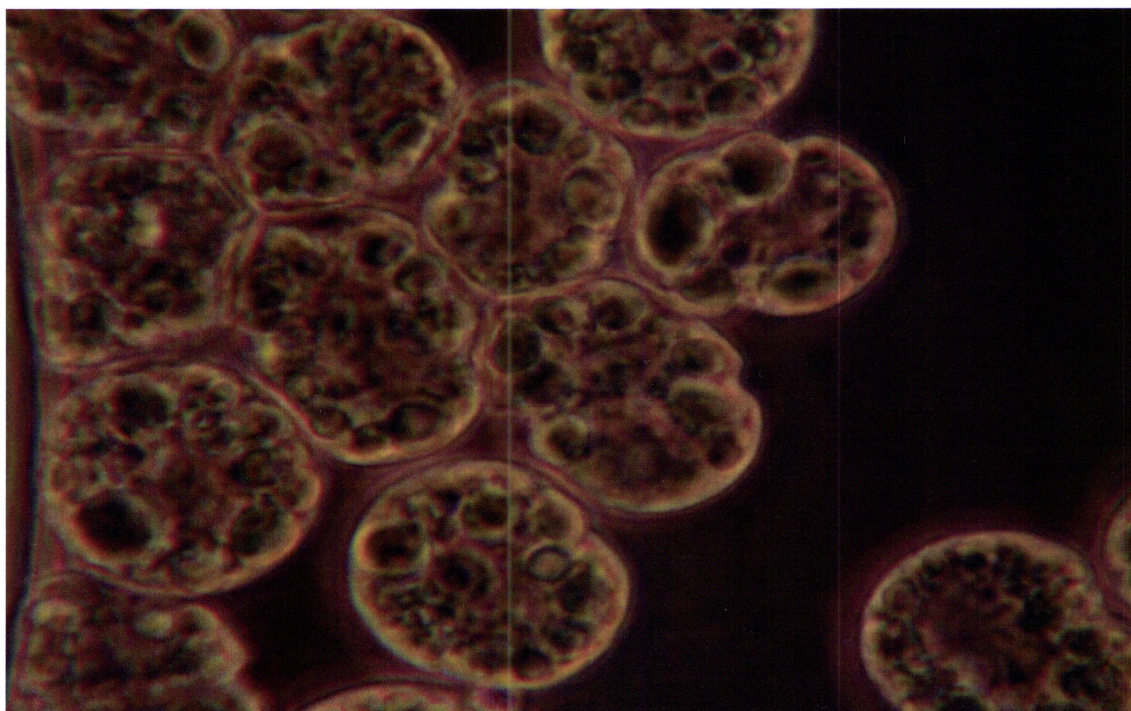
Neste trabalho procurou-se combinar as duas abordagens anteriormente referidas. Por um lado a opção por uma estratégia de crescimento em *fed-batch* que permita manter o substrato abaixo de valores inibitórios ou saturantes e, por outro lado, a utilização de um substrato de baixo custo, um sub-produto da indústria de alfarroba (polpa de alfarroba) mais barato que os substratos utilizados convencionalmente. No caso de Portugal, terceiro produtor mundial de alfarroba, esta opção constitui uma mais-valia em termos de valorização do potencial endógeno, quer regional (Algarve e Alentejo), quer nacional.

Foram optimizadas as condições de cultura (temperatura e transferência de massa de oxigénio) de *Cryptocodinium cohnii* e testadas várias fontes de carbono (glucose, frutose, glicerol e xarope de alfarroba) e azoto (extracto de levedura e cloreto de amónio) em frasco agitado. As condições optimizadas foram depois testadas em fermentadores de bancada com vista ao *scale-up*.

Foi ainda desenvolvida uma técnica de purificação/concentração de DHA de baixo custo (partindo da biomassa húmida) de forma a obter este ácido gordo com o grau de pureza requerido para aplicações farmacêuticas, isto é, pureza superior a 95% (Ratledge, 2004).

CAPÍTULO 2

Revisão da literatura



Crypthecodinium conhii (Seligo) CCMP 316. Ampliação (× 1000)

Capítulo 2 – Revisão da literatura

2.1 Ácidos Gordos

Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos. Regra geral, estes ácidos são monocarboxílicos, de cadeia linear não ramificada e compreendem um número par de átomos de carbono (Weil, 2000a; Scrimgeour, 2005). A maioria dos ácidos gordos que ocorre na natureza possui um número de átomos de carbono compreendido entre 4 e 22, sendo mais comuns os ácidos gordos com 18 átomos de carbono (Scrimgeour, 2005).

Os ácidos gordos podem ser saturados (sem ligações duplas) ou insaturados (contendo entre 1 e 6 ligações duplas) e por vezes são ramificados e/ou hidroxilados. Encontram-se nos sistemas biológicos, sobretudo como componentes dos lípidos, geralmente esterificados e, só em pequenas quantidades no estado livre.

O nome sistemático de um ácido gordo obtém-se a partir do nome do hidrocarboneto com o mesmo número de átomos de carbono substituindo o o final pelo sufixo óico e fazendo anteceder o nome da palavra *ácido* (IUPAC, 1971). A contagem dos átomos de carbono de um ácido gordo faz-se a partir do átomo de carbono do grupo carboxilo terminal (carbono1) (IUPAC-IUB, 1978). Se o ácido gordo for insaturado, a posição de cada uma das ligações duplas é indicada pelo número mais baixo do átomo de carbono que participa na ligação precedido do símbolo “ Δ ” que representa a distância ao átomo de carbono do grupo carboxilo (O’Keefe, 2008).

Para além do nome sistemático e do nome comum existem dois sistemas abreviados de nomenclatura utilizados frequentemente. Em ambos os sistemas os ácidos gordos são representados usando uma notação simples. Dois números separados por dois pontos indicam o número total de átomos de carbono e o número de ligações duplas, respectivamente (Ratledge, 1997; Scrimgeour, 2005). A forma como é indicada a posição das duplas ligações distingue os dois sistemas.

Num dos sistemas, o primeiro a surgir cronologicamente, a contagem dos átomos de carbono faz-se do grupo carboxilo terminal (carbono 1) para o grupo CH₃ (carbono *n*), tal como no sistema proposto pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* – IUPAC. As ligações duplas são indicadas pelo símbolo “ Δ ”, acompanhado do número correspondente ao primeiro átomo de carbono que participa em cada uma das duplas ligações. Este sistema difere do proposto pela IUPAC pelo facto de utilizar

Tabela 1 – Alguns ácidos gordos que ocorrem na natureza.

| Nome comum | Nome sistemático* | Notação abreviada |
|---|---|-------------------|
| 1.2.2.1 Ácidos gordos saturados | | |
| Ácido láurico | Ácido dodecanóico | 12:0 |
| Ácido mirístico | Ácido tetradecanóico | 14:0 |
| Ácido palmítico | Ácido hexadecanóico | 16:0 |
| Ácido esteárico | Ácido octadecanóico | 18:0 |
| Ácidos gordos monoinsaturados | | |
| Ácido palmitoleico | Ácido 9-hexadecenóico | 16:1 ω-7 |
| Ácido oleico | Ácido 9-octadecenóico | 18:1 ω-9 |
| Ácidos gordos poli-insaturados ω-6 | | |
| Ácido linoleico (LA) | Ácido 9, 12-octadecadienóico | 18:2 ω-6 |
| Ácido γ-linolénico (GLA) | Ácido 6, 9, 12-octadecatrienóico | 18:3 ω-6 |
| Ácido araquidónico (AA) | Ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenóico | 20:4 ω-6 |
| Ácidos gordos poli-insaturados ω-3 | | |
| Ácido α-linolénico (ALA) | Ácido 9, 12, 15-octadecatrienóico | 18:3 ω-3 |
| Ácido eicosapentaenóico (EPA) | Ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenóico | 20:5 ω-3 |
| Ácido docosahexaenóico (DHA) | Ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenóico | 22:6 ω-3 |

* Todas as ligações duplas em configuração *cis*

A configuração das ligações duplas nos ácidos gordos que ocorrem na natureza é geralmente assumida como *cis* (Z). Se não for este o caso, tal deve ser indicado como “c” (para *cis*=Z) ou “t” (para *trans*=E) (Ratledge, 1997).

Quando os ácidos gordos estão esterificados com glicerol, formam-se mono, di e triacilgliceróis (figura 2) onde R representa a cadeia alquilo e, portanto, RCO representa o grupo acilo do ácido gordo.

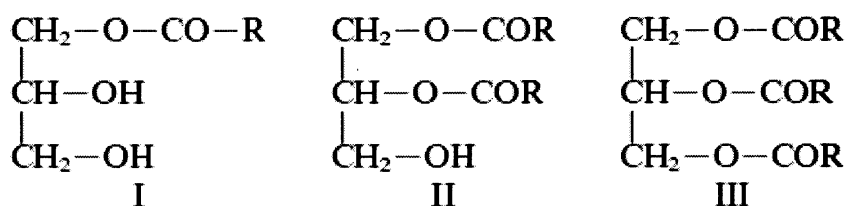


Figura 2 – Representação esquemática de acilgliceróis (Ratledge, 1997).

I – monoacilglicerol, II – diacilglicerol e III – triacilglicerol.

Como são possíveis vários isómeros, a posição em que se faz a ligação da cadeia acilo tem de ser especificada. Para tal utiliza-se o sistema de numeração estereoespecífico (*sn*-) (figura 3).

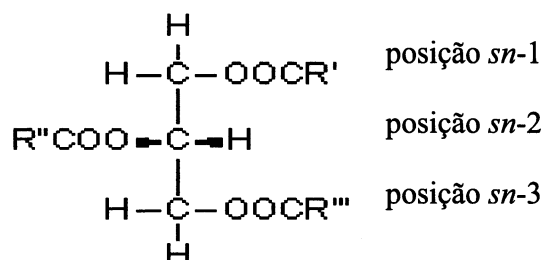


Figura 3 – Projecção de Fischer de um triacilglicerol. R', R'' e R''' representam cadeias alquilo.

As propriedades dos ácidos gordos e dos lípidos com eles formados dependem do tamanho da cadeia e do grau de insaturação.

Os ácidos gordos saturados são moléculas muito flexíveis que podem assumir uma grande variedade de conformações devido à rotação relativamente livre em torno de cada ligação C-C. Apesar disso, a sua energia conformacional mais baixa, à qual está associada um mínimo de impedimento estereoquímico entre grupos metileno vizinhos, corresponde à molécula distendida. Assim, os pontos de fusão dos ácidos gordos saturados aumentam com o tamanho da molécula (Voet et al., 1999).

O facto de nos ácidos gordos insaturados, as ligações duplas apresentarem configuração *cis* impõe uma certa rigidez à cadeia carbonada, pelo que o empacotamento destes ácidos gordos é menos eficiente que o dos ácidos gordos saturados. A redução das interações de van der Waals nos ácidos gordos insaturados faz com que o seu ponto de fusão diminua com o aumento da insaturação, facto que se traduz no aumento da fluidez dos lípidos com o aumento da insaturação dos ácidos gordos que os constituem (Voet et al., 1999).

Menos conhecidos que os efeitos da estrutura dos ácidos gordos são os efeitos da sua distribuição posicional na cadeia de glicerol (Wijesundera et al., 2008).

2.2 Ácidos gordos poli-insaturados

Os ácidos gordos poli-insaturados (PUFAs) são ácidos gordos com 16 ou mais átomos de carbono e duas ou mais ligações duplas (Chemler et al., 2006). Dependendo da posição da dupla ligação mais próxima do terminal metilo os PUFAs podem ser classificados em vários grupos dos quais os principais são as famílias ω -3 e ω -6. Se os ácidos gordos possuírem 20 ou mais átomos de carbono e 4, 5 ou 6 ligações duplas, são designados ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa (*Very-Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids* – VLCPUFAs) (Abadi et al., 2004).

Os ácidos gordos poli-insaturados estão presentes nos animais e plantas mas a maior diversidade encontra-se em microrganismos, sobretudo algas, fungos e bactérias (Gill & Valivety, 1997). Algas, fungos, bactérias, insectos e outros invertebrados possuem as enzimas necessárias à produção, *de novo*, de vários PUFAs e, como tal, são considerados os produtores primários destes compostos na natureza (Gill & Valivety, 1997). As plantas superiores não produzem PUFAs com mais de 18 átomos de carbono (Gill & Valivety, 1997) e, nos animais superiores, os PUFAs podem ser obtidos através da alimentação ou ser sintetizados a partir dos “ácidos gordos essenciais” através de um sistema de insaturação/elongação (Leonard et al., 2004).

O termo “essencial” está relacionado com os mamíferos e, mais concretamente com o Homem (Radwan, 1991). A via biossintética dos ácidos gordos no Homem é mais limitada que a das plantas e microrganismos. As plantas insaturam entre o carbono 9 e o carbono ω . As algas e algumas plantas insaturam em ambos os sentidos, isto é, entre o carbono 9 e o carbono ω ou entre o carbono 9 e o terminal carboxilo (Halpern, 1997). Os mamíferos não conseguem introduzir duplas ligações entre o átomo de carbono 9 (C_9) e o terminal metilo (Radwan, 1991; Halpern, 1997) e como tal, não conseguem sintetizar os ácidos linoleico ($18:2 \Delta^9, \Delta^{12}$) e linolénico ($18:3 \Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$) *de novo*. No entanto, os mamíferos necessitam destes dois ácidos gordos que têm de obtidos através da alimentação e são, por isso, designados de “essenciais”.

A designação “ácidos gordos essenciais” levanta, contudo, alguns problemas. Definir nutriente “essencial” como aquele que é necessário para o desenvolvimento e funcionamento normal das células animais ao longo do seu ciclo de vida significa que, quer na sua forma activa quer como precursor, há uma quantidade mínima deste nutriente que deve ser obtida regularmente através da alimentação. Contudo, as necessidades variam de espécie para espécie e, dentro de cada espécie, variam com o

género, com a idade e na presença de alterações fisiológicas ou patológicas (gravidez, lactação, infância, velhice, infecção, doença, etc.) (Cunnane, 2003).

Com base em estudos nutricionais, Cunnane (2003) considera que o termo “ácido gordo essencial” é ambíguo e inapropriado para muitos ácidos gordos poli-insaturados. Quando aplicado rigidamente ao 18:2 ω -6 e 18:3 ω -3, o termo exclui as necessidades, aceites mas condicionadas pela alimentação, dos ácidos gordos poli-insaturados 20:4 ω -6 e 22:6 ω -3, durante a infância. O autor propõe a substituição dos termos essencial e não essencial por “dispensável”, “condicionalmente dispensável”, “condicionalmente indispensável” ou “indispensável” (Cunnane, 2000; 2003). Neste trabalho optar-se-á pela substituição do termo “ácido gordo essencial” pela terminologia ácido gordo poli-insaturado ω -3 ou ω -6 e pela indicação dos nomes dos ácidos gordos em questão.

2.2.1 Biossíntese

Elongação de cadeia

A síntese de ácidos gordos ocorre no citosol por uma via diferente da β -oxidação (Rawn, 1989), facto que permite que ambos os processos sejam termodinamicamente favoráveis e regulados independentemente nas mesmas condições fisiológicas (Voet et al., 1999). A acetil-coenzima A (acetil-CoA) gerada nas mitocôndrias é transportada para o citosol sob a forma de citrato (Halpern, 1997) via sistema de transporte tricarboxilato (Voet et al., 1999).

Na síntese de ácidos gordos a acetil-CoA é convertida no ácido palmítico (16:0) pelo complexo multienzimático sintetase de ácidos gordos (*Fatty Acid Synthetase* – FAS). O primeiro passo deste processo (tabela 2) é a formação do malonil-CoA por carboxilação da acetil-CoA, uma reacção dependente de ATP (*Adenosine Triphosphate*) que é catalisada pela acetil-CoA-carboxilase (a coenzima é a biotina que fixa HCO_3^- da solução e, a partir dele, transfere CO_2). O dióxido de carbono envolvido nesta reacção é libertado posteriormente.

Tabela 2 – Principais reacções na síntese de ácidos gordos em bactérias (Stryer, 1988)

| Passos | Reacção | Enzima |
|--------|--|--------------------------------------|
| 1 | $\text{Acetil-CoA} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \rightarrow \text{malonil-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$ | Acetil-CoA carboxilase |
| 2 | $\text{Acetil-CoA} + \text{ACP} \rightleftharpoons \text{acetil-ACP} + \text{CoA}$ | Acetil transacilase |
| 3 | $\text{Malonil-CoA} + \text{ACP} \rightleftharpoons \text{malonil-ACP} + \text{CoA}$ | Malonil transacilase |
| 4 | $\text{Acetil-ACP} + \text{malonil-ACP} \rightarrow \text{acetoacetil-ACP} + \text{ACP} + \text{CO}_2$ | Acil-malonil-ACP |
| 5 | $\text{Acetoacil-ACP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{D-}\beta\text{-hidroxibutiril-ACP} + \text{NADP}^+$ | β -cetoacil-ACP-redutase |
| 6 | $\text{D-}\beta\text{-hidroxibutiril-ACP} \rightleftharpoons \text{crotonil-ACP} + \text{H}_2\text{O}$ | β -hidroxiacil-ACP-desidratase |
| 7 | $\text{Crotonil-ACP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{butiril-ACP} + \text{NADP}^+$ | Enoil-ACP redutase |

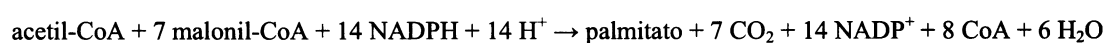
Os grupos acilo da acetil-CoA e do malonil-CoA são transferidos, respectivamente, por uma acetil-transferase (passo 2) e por uma malonil-transferase (passo 3) para uma pequena proteína transportadora de grupos acilo (*Acil Carrier Protein* – ACP), cujo grupo prostético é a fosfopanteteína (Weil, 2000b). O acetil-ACP e o malonil-ACP reagem então para formar o acetoacetil-ACP, numa reacção de condensação catalisada por uma enzima condensadora acetil-malonil-ACP (passo 4). Todos os átomos do acetoacetil-ACP provêm da acetil-CoA e a descarboxilação que ocorre neste passo favorece a reacção directa (Campos, 2002).

O acetoacetil-ACP é então reduzido a D- β -hidroxibutiril-ACP numa reacção catalisada pela β -cetoacil-ACP-redutase em que o redutor é o NADPH (passo 5). Por desidratação, catalisada pela β -hidroxiacil-ACP-desidratase, forma-se então o crotonil-ACP (passo 6) que, por redução catalisada pela enoil-ACP-redutase, dá origem ao butiril-ACP (passo 7).

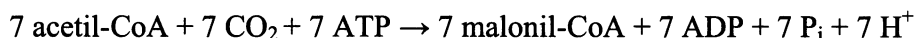
No prosseguimento do processo, o butiril-ACP formado reage com uma nova molécula de malonil-ACP (a qual foi entretanto transferida para a enzima condensadora). Após outra sequência de reacções como a descrita, obtém-se uma cadeia de ácido gordo com mais dois átomos de carbono (uma cadeia em C₆), e assim sucessivamente.

O principal ácido gordo formado é geralmente o ácido palmítico (C₁₆) (Weil, 2000b). Após mais cinco sequências de condensação e redução forma-se o palmitoil-CoA. A ligação tioéster é depois hidrolisada pela palmitoil-tiosterase, para formar o palmitato.

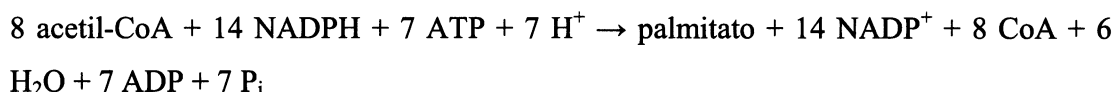
A estequiometria da síntese do palmitato é (Voet et al., 1999):



uma vez que 7 malonil-CoA são derivados do acetil-CoA segundo:



A estequiometria da reacção global é



A biossíntese de ácidos gordos pode, assim, ser representada por uma hélice (hélice de Wakil), em que cada espira corresponde à adição de uma unidade com dois átomos de carbono provenientes da acetil-CoA, sendo o dador activo dessas unidades o malonil-CoA (Campos, 2002).

A etapa limitante da biossíntese é a reacção catalisada pela acetil-CoA-carboxilase. A enzima é activada pelo citrato e inibida pela palmitoil-CoA e outras acil-CoA de cadeia longa (Voet, 1999). Ocorre também uma regulação por fosforilação-desfosforilação: a fosforilação por uma proteína-cinase converte a enzima em forma inactiva, e a acção de uma fosfatase torna-a activa (Voet et al., 1999; Campos, 2002).

Existem dois tipos de ácido gordo sintetase: tipo I, presente nos mamíferos, aves, leveduras, fungos e algumas bactérias, em que a actividade enzimática está localizada numa ou em duas cadeias polipeptídicas (Torkko, 2003; de Swaaf, 2003; Asturias, 2006; Ploskón et al., 2008) e tipo II, presente em procariontes e plantas, em que a actividade enzimática está presente em cadeias polipeptídicas separadas, isto é, enzimas individuais (Torkko, 2003; de Swaaf, 2003; Asturias, 2006; Ploskón et al., 2008). Assim, nos eucariontes, as reacções 2 a 7 (tabela 2) são catalisadas pelo complexo polienzimático sintetase de ácidos gordos (FAS) cuja forma funcional, nos mamíferos, é um homodímero com dois centros para a síntese de ácidos gordos (Astúrias, 2006).

O alongamento pelo complexo sintetase de ácidos gordos termina com a formação do palmitato (C₁₆). Este pode depois ser convertido em ácidos gordos de cadeia mais longa, saturados e insaturados, por acção de elongases e dessaturases (Voet et al., 1999). As elongases são enzimas responsáveis por incrementos de dois átomos de carbono no terminal carboxilo da cadeia acilo de um ácido gordo (Leonard et al., 2004). As dessaturases são enzimas que catalisam a adição de ligações duplas (insaturações) entre átomos de carbono específicos da cadeia acilo (Los & Murata, 1998; Murata &

Wade, 1995; Pereira et al., 2003) e cuja nomenclatura é feita de acordo com a posição da ligação dupla que introduzem (Pereira et al., 2003).

As elongases estão presentes quer nas mitocôndrias quer no retículo endoplasmático mas os mecanismos de elongação diferem consoante o local em que a elongação ocorre (Voet et al., 1999).

A elongação mitocondrial (processo independente da síntese de ácidos gordos do citosol) ocorre por adições e reduções sucessivas de unidades de acilo, ou seja, no sentido inverso da oxidação dos ácidos gordos. A única diferença entre estas duas vias ocorre na reacção de redução final, na qual a coenzima redox terminal é o NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*), forma reduzida, em vez do FADH₂ (*Flavin Adenin Dinucleotide*) forma reduzida (Voet et al., 1999).

O sistema de elongação de cadeia dos ácidos gordos (*Fatty Acid Chain Elongation System* – FACES) no retículo endoplasmático é constituído por quatro enzimas: uma enzima condensadora (β -cetoacil CoA sintetase, KCS), β -cetoacil CoA redutase (KCR), β -hidroxiacil CoA desidratase, e *trans*-2-enoil CoA redutase (fig.4).

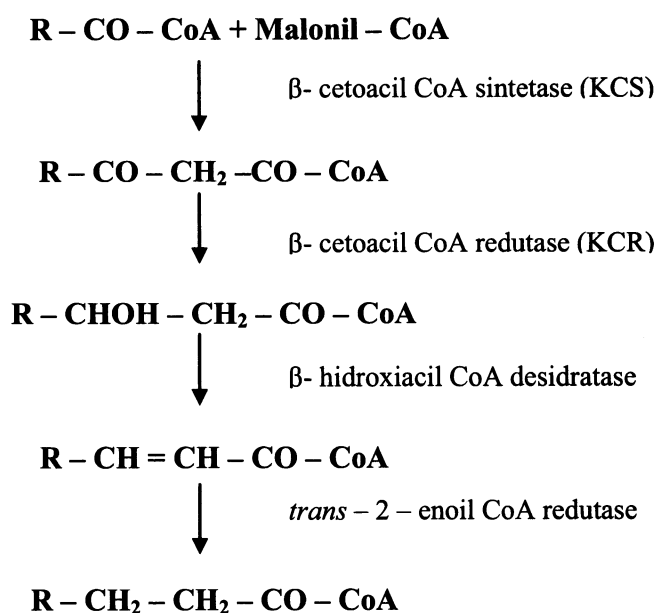


Figura 4 – Reacção de elongação de cadeia de ácidos gordos (Leonard et al., 2004).

A elongação envolve sucessivas condensações do malonil-CoA com o acil-CoA. Cada uma destas reacções é seguida por reacções de redução dependentes do NADPH, similares às catalisadas pela sintetase de ácidos gordos; a única diferença é que o ácido

gordo é alongado na forma derivada da CoA e não na forma derivada da ACP (Voet et al., 1999; Wallis et al., 2002).

Na célula existem múltiplos sistemas de alongação microssomais com especificidade para diferentes comprimentos de cadeia (Leonard et al., 2004). Os resultados experimentais sugerem a existência de sistemas de alongação responsáveis pela síntese de ácidos gordos saturados com diferente comprimento de cadeia: um para o alongamento do ácido palmítico (16:0) a ácido esteárico (18:0), outro para o alongamento do ácido esteárico a ácido araquídico (20:0) e um terceiro para o alongamento do ácido araquídico a ácido behénico (22:0) e ácido linhocérico (24:0). Existem também diferentes sistemas de alongação responsáveis pela alongação de ácidos gordos saturados *versus* insaturados, isto é, sistemas enzimáticos específicos responsáveis pelo aumento do tamanho da cadeia de ácidos gordos de diferentes comprimentos de cadeia e diferentes graus de insaturação (Leonard et al., 2004; Jakobsson et al., 2006).

Insaturação

Ao longo dos últimos 25 anos e, a partir do momento em que ficou bem documentada a importância dos ácidos gordos poli-insaturados na biologia das membranas celulares e nos processos de sinalização da maioria dos organismos vivos, as vias biossintéticas dos PUFAs de cadeia longa têm sido alvo de interesse e estudo (Napier et al., 2003). Contudo, só recentemente, com o contributo da genética molecular, surgiram estudos detalhados das enzimas envolvidas.

Apesar das vias biossintéticas dos PUFAs na maioria dos organismos não ser ainda completamente conhecida, apresenta-se na figura 5 uma visão generalizada das vias biossintéticas ω -3 e ω -6 à luz dos conhecimentos actuais. Apenas uma delas é anaeróbia.

Vias aeróbias

Como já foi referido, a biossíntese dos ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa é catalisada por uma sequência de reacções de insaturação e alongação da cadeia acilo e tem como ponto de partida os ácidos gordos saturados 16:0 e 18:0 formados pelo complexo sintetase de ácidos gordos (FAS) e pelo sistema de alongação de cadeia (FACES).

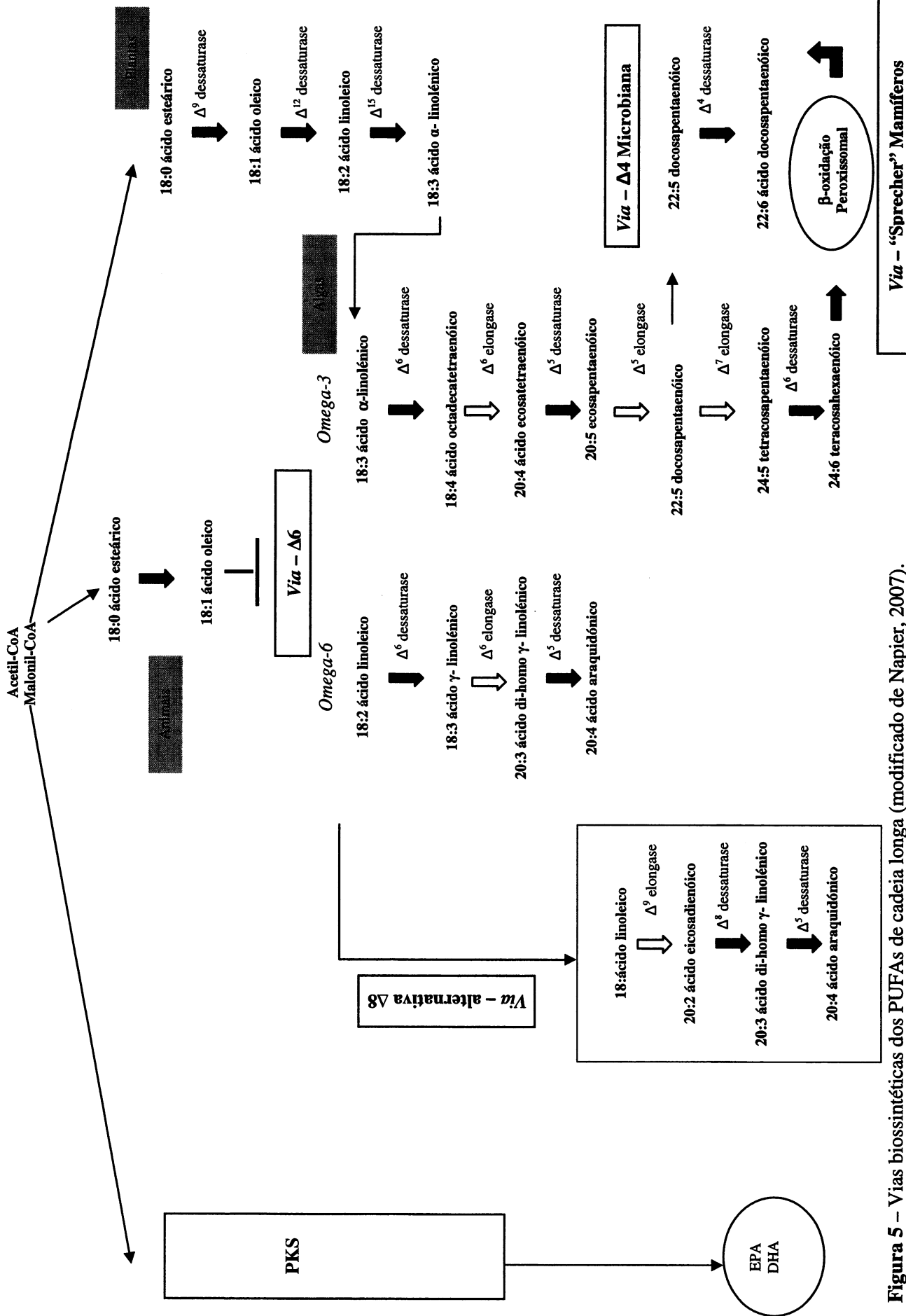


Figura 5 – Vias biossintéticas dos PUFAs de cadeia longa (modificado de Napier, 2007).

As reacções de insaturação (dessaturação), catalisadas por dessaturases de ácido gordo, são processos aeróbios que utilizam o oxigénio molecular e redutores equivalentes (electrões) obtidos de uma cadeia de transporte de electrões (Tocher et al., 1998; Pereira et al., 2003).

Existem três tipos de dessaturases de ácido gordo: dessaturases acil-CoA, acil-lípido e acil-ACP (Tocher et al., 1998; Certik & Shimizu, 1999; Pereira et al., 2003; Nakamura & Nara, 2004). As dessaturases podem ser solúveis ou estar associadas a membranas (Sperling et al., 2003; Roper, 2003; Nakamura & Nara, 2004). As dessaturases acil-CoA estão ligadas à membrana do retículo endoplasmático e insaturam ácidos gordos esterificados a coenzima A (Tocher et al., 1998; Certik & Shimizu, 1999); estão presentes nas células de animais, leveduras e fungos (Pereira et al., 2003). As dessaturases acil-ACP encontram-se nos plastídeos das plantas numa forma solúvel, e insaturam ácidos gordos ligados a uma proteína transportadora de grupos acilo (ACP) (Tocher et al., 1998; López Alonso et al., 2003; Sperling et al., 2003; Pereira et al., 2003). As dessaturases acil-lípido introduzem ligações nos ácidos gordos esterificados em glicerolípidos (Tocher et al., 1998); estão ligadas à membrana e encontram-se em plantas, fungos e cianobactérias (Pereira et al., 2003). As dessaturases podem ser posteriormente organizadas de acordo com o dador de electrões utilizado (citocromo *b₅* versus ferredoxina), com as respectivas redutases, e com NADH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*), forma reduzida ou com NADPH (Tocher et al., 1998; Pereira et al., 2003). As dessaturases acil-CoA dos animais e as dessaturases acil-lípido das plantas e fungos utilizam geralmente o citocromo *b₅* como dador de electrões (Pereira et al., 2003; Nakamura & Nara, 2004). A ferredoxina actua como dador de electrões para as dessaturases acil-ACP e para as dessaturases acil-lípido nos plastídeos das plantas e nas cianobactérias (Nakamura & Nara, 2004). As dessaturases são específicas no que se refere à localização, número e estequiometria das duplas ligações presentes à partida nos ácidos gordos. Por exemplo, uma dessaturase $\Delta 9$ pode apenas introduzir uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 da cadeia acilo (átomos de carbono numerados a partir do grupo carboxilo- C_1) (Pereira et al., 2003).

Em organismos diferentes a presença/ausência das enzimas e a regulação diferenciada da sua actividade conduz a perfis de ácidos gordos completamente diferentes (de Swaaf, 2003).

Ao longo dos últimos anos, as sequências de codificação da actividade enzimática das enzimas envolvidas na biossíntese microsomal de ácidos gordos poli-

insaturados foram identificadas, isoladas e expressas em vários hospedeiros heterólogos (Tabela 3). Os resultados desses estudos ajudaram a compreender a bioquímica das elongases e dessaturases e a regulação da biossíntese de PUFAs (Bergé & Barnathan, 2005).

Tabela 3 – Origem dos genes disponíveis para codificar cDNAs dessaturases e elongases envolvidas na biossíntese de LCPUFAs (Bergé & Barnathan, 2005).

| Enzima | 1.2.2.1.1.1.1 Organismo |
|------------------------|--|
| $\Delta 4$ dessaturase | <i>Thraustochytrium</i> sp |
| $\Delta 5$ dessaturase | <i>Homo sapiens</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Mortierella alpina</i> |
| $\Delta 6$ dessaturase | <i>Homo sapiens</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Borago officinalis</i> <i>Ceratodon purpureus</i> <i>Physcomitrella patens</i> <i>Mortierella alpina</i> |
| $\Delta 8$ dessaturase | <i>Euglena gracilis</i> |
| (n-3) dessaturase | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| $\Delta 6$ elongase | <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Mortierella alpina</i> <i>Physcomitrella patens</i> |

Não se conhecem plantas angiospérmicas que acumulem nas suas reservas de triacilgliceróis ou nos lípidos de membrana ácidos gordos poli-insaturados com mais de 18 átomos de carbono (Abadi et al., 2001; Green, 2004; Ratledge, 2004); elas convertem o ácido oleico (18:1) nos ácidos linoleico (18:2) e linolénico (18:3), substratos para a síntese de C₂₀, mas são incapazes de alongar mais a cadeia acilo (Bergé & Barnathan, 2005). Nas plantas, os ácidos gordos 16:0 e 18:0 são produzidos, quase exclusivamente nos cloroplastos (ou plastídeos) (López Alonso & Garcia Maroto, 2000) como tioésteres da proteína transportadora de grupos acilo pelo sistema sintetase de ácidos gordos (Wallis et al., 2002). É na cadeia de 18 átomos de carbono que pode ser introduzida, através de uma dessaturase, uma dupla ligação entre C₉ e C₁₀ para formar oleil-ACP que, por transacilação, dá origem ao oleil-CoA. O 18:1 pode ser incorporado directamente nos glicerolípidos dos plastídeos ou ser transportado para o retículo endoplasmático para posterior transformação – alongamento, hidroxilação ou insaturação (Campos, 2002). Uma dessaturase ligada à membrana adiciona uma

segunda dupla ligação na posição $\Delta 12$ ao oleil-CoA para formar 18:2, e a adição de uma terceira ligação na posição n-3 dá origem o 18:3 (n-3) (Wallis et al., 2002).

Os mamíferos convertem 18:0 a 18:1(n-9) usando uma dessaturase 18:0-CoA, $\Delta 9$, ligada à membrana (Wallis et al., 2002). Contudo, falta-lhes as dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$ (n-3) (fig. 4) e portanto, necessitam de obter os ácidos 18:2(n-6) e 18:3(n-3) a partir da alimentação (Fidler et al. 1999; Wallis et al., 2002; Calder & Grimble, 2002; Pereira et al., 2003; Pereira et al., 2004a). Por não possuírem a dessaturase $\Delta 15$ também não conseguem interconverter os ácidos gordos n-3 e n-6 (Calder & Grimble, 2002). Os ácidos gordos 18:2(n-6) e 18:3(n-3) são depois dessaturados e alongados no retículo endoplasmático (Tocher et al., 1998; Wallis et al., 2002; Bergé & Barnathan, 2005) de forma diferente consoante a espécie, a actividade das dessaturases $\Delta 6$ e $\Delta 5$ e a localização no tecido (Pereira et al., 2003). Por exemplo, nos gatos, a expressão da dessaturase $\Delta 6$ é reduzida ou inexistente (Gurr, 1998) mas a dessaturase $\Delta 5$ está operacional (Sinclair et al., 1979); o peixe marinho tem uma actividade limitada de dessaturase $\Delta 5$ e necessita dos PUFAs EPA (20:5n-3) e DHA (22:6n-3) (Lall, 2000) embora possua dessaturases $\Delta 6$ funcionais (Tocher & Ghioni, 1999), enquanto o peixe de água doce, como a truta e a carpa, possui dessaturases $\Delta 6$ e $\Delta 5$ e pode sintetizar AA, EPA e DHA (Henderson, 1996; Hastings et al., 2001). Certos tecidos dos mamíferos possuem maiores concentrações de DHA que outros (é o caso do cérebro e da retina no Homem), provavelmente devido a uma maior expressão dos genes da dessaturase envolvida na produção de DHA (Innis, 1991; Pereira et al., 2003).

Do estudo das vias biossintéticas dos PUFAs de cadeia longa, efectuado ao longo dos últimos dez anos em algas, invertebrados e mamíferos emergiu uma via particular, a chamada via- $\Delta 6$, como principal via biossintética em eucariontes (Napier, 2007).

Na via- $\Delta 6$ uma dessaturase $\Delta 6$ utiliza os ácidos gordos 18:2(n-6) e 18:3(n-3) como substratos e insere uma ligação dupla na cadeia acilo dando origem aos ácidos 18:3(n-6) e 18:4(n-3), respectivamente (Wallis et al., 2002). Esta etapa é o passo limitante da síntese dos ácidos gordos de cadeia longa (Pereira et al., 2003; Benatti et al., 2004; Williams & Burdge, 2006). Os ácidos gordos com uma ligação dupla na posição $\Delta 6$, funcionam então como substratos para o mecanismo de alongação que utiliza a malonil-CoA para adicionar dois átomos de carbono ao terminal carboxilo do ácido gordo produzindo 20:3(n-6) e 20:4(n-3) que, por acção da dessaturase $\Delta 5$, dão origem aos ácidos gordos 20:4(n-6) e 20:5(n-3) (Wallis et al., 2002).

Neste ponto, ocorre uma divisão na biossíntese dos PUFAs de cadeia longa. Nos eucariontes inferiores o EPA é elongado a ácido docosapentaenóico (*Docosapentaenoic Acid* – DPA) (22:5(n-3)) e uma ligação dupla é então adicionada directamente ao DPA por uma $\Delta 4$ dessaturase para formar o DHA (Huang et al., 2004). Esta sequência é a mais simples e ocorre em vários eucariontes unicelulares (Bergé & Barnathan, 2005). A dessaturase $\Delta 4$ foi identificada pela primeira vez no protista marinho *Thraustochytrium* sp. (Qiu et al., 2001) e, posteriormente, em *Euglena gracilis* (Meyer et al., 2003), *Pavlova* (Tonon et al., 2003) e *Isochrysis* (Pereira et al., 2004b).

Nos mamíferos e eucariotes superiores só recentemente foi decifrada a via que conduz à síntese do DHA a partir do ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5(n-3)). Até 1991, era postulado que uma dessaturase $\Delta 4$ catalisava a conversão do DPA em DHA nos microssomas. Contudo, estudos com marcadores radioactivos em células animais revelaram uma via biossintética diferente (Voss et al., 1991; Sprecher et al., 1995; Sprecher, 2000), também chamada via biossintética de Sprecher, na qual o DPA é elongado a 24:5(n-3), que é depois dessaturado para formar o ácido tetracosahexaenóico (THA, 24:6 (n-3)) nos microssomas (Pereira et al., 2003) (fig.4). Este é depois transportado para os peroxissomas onde sofre β -oxidação (retroconversão) e forma DHA (Luthria et al., 1996; Infante & Huszagh, 1998; Sprecher, 2000; Ferdinandusse et al., 2001; Wallis et al., 2002; Pereira et al., 2003). O DHA é depois, translocado novamente para o retículo endoplasmático (Burdger & Calder, 2005; Williams & Burdge, 2006). O mecanismo específico e as enzimas envolvidas na retroconversão e na translocação ainda não são totalmente conhecidos (Sprecher et al., 1999; Pereira et al., 2003; Burdge & Calder, 2005). Por esta via, a síntese do DHA a partir da acetil-CoA envolve aproximadamente 30 enzimas diferentes e requer 70 reacções, incluindo os 4 passos repetidos da sintetase de ácidos gordos (Metz et al., 2001; Wallis et al., 2002; a, 2009). Assim, a síntese de DHA nos mamíferos é um processo bioquímico muito mais complexo que nos micróbios facto que pode, em parte, explicar a fraca capacidade dos humanos para sintetizar este ácido gordo (Napier, 2007). Por outro lado, o EPA e o DPA podem também ser sintetizados a partir do DHA, obtido através da alimentação, por β -oxidação peroxissomal (Ruxton et al., 2005) sendo que, no Homem, aproximadamente 1% do DHA pode ser reconvertido a EPA (Brossard et al., 1996).

Para a síntese de ácidos gordos ω -6 (ácido docosapentaenóico, 22:5(n-6)) a partir do LA são possíveis os mesmos passos alternativos de insaturação/elongação (via dessaturase $\Delta 4$ ou via β -oxidação) (Leonard, 2004; Calder, 2004).

Uma via biossintética alternativa, via- $\Delta 8$, foi identificada em alguns protistas como, por exemplo, *Euglena gracilis* (Wallis & Browse, 1999). Começa com um passo de alongação, envolvendo uma elongase- $\Delta 9$, seguido de insaturações $\Delta 8$ e $\Delta 5$ consecutivas para formar AA ou EPA, consoante o substrato metabolizado é o LA ou o ALA (Qi et al., 2004; Napier & Sayanova, 2005). Também a microalga *Isochrysis galbana* pode utilizar uma dessaturação $\Delta 8$ para a síntese de EPA e DHA (Qi et al., 2002).

Via anaeróbia

Várias estirpes de bactérias produtoras de ácidos gordos poli-insaturados podem fazê-lo em condições estritamente anaeróbias, excluindo a participação de um mecanismo dependente do oxigénio. A designação de anaeróbia para esta via significa que o oxigénio não está envolvido na síntese das ligações duplas embora o organismo possa crescer aerobiamente (Qiu, 2003; Ratledge, 2004). Este sistema não necessita das múltiplas elongases e dessaturases atrás referidas e, em vez disso, utiliza um gene como a sintetase de policétidos (*Polyketide Synthase-like* – PKS), presente nos micróbios marinhos procariontes e eucariontes, para sintetizar os ácidos gordos poli-insaturados (Napier, 2002).

O sistema multienzimático PUFA-PKS foi descrito pela primeira vez para *Shewanella* sp., uma bactéria marinha rica em EPA e, desde então tem sido identificado em vários organismos, procariontes e eucariontes, produtores de EPA, DHA e ω -6 DPA (Metz et al., 2001) incluindo a bactéria *Moritella marina* MP-1 (*Vibrio marinus*) (Tanaka et al., 1999).

Neste sistema enzimático, o ciclo completo de redução, desidratação, e redução de um ácido gordo é, muitas vezes, abreviado dando origem a cadeias de carbono contendo grupos cetona e hidroxilo além de ligações duplas em configuração *trans* (fig.6) (Metz et al., 2001; Bergé & Barnathan, 2005; Barclay et al., 2005). Além disso, os produtos do PKS sofrem muitas vezes um processo de ciclização dando origem a produtos bioquímicos complexos que incluem antibióticos, aflatoxinas e outros produtos secundários (Metz et al., 2001; Bergé & Barnathan, 2005; Barclay et al., 2005).

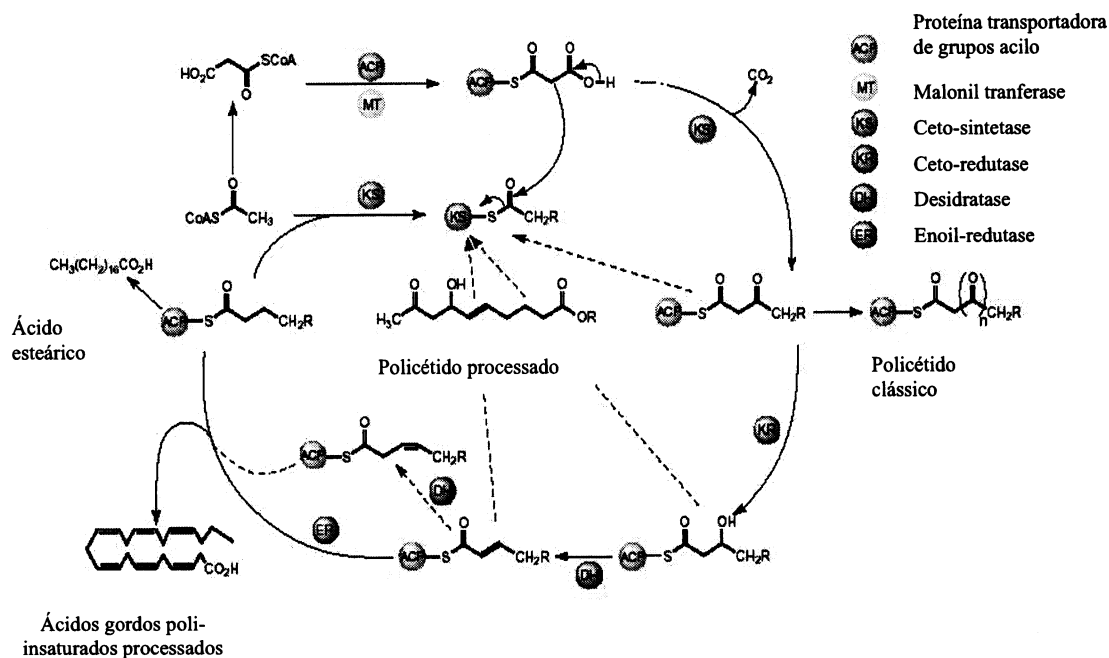


Figura 6 – Esquema geral para a síntese de PUFAs pelo sistema PKS (Napier, 2002).

No sistema PKS as ligações duplas em configuração *cis* são introduzidas na cadeia de carbono *via* um mecanismo de desidratação/isomerização em vez de serem introduzidas por reacções de insaturação dependentes do oxigénio (Barclay et al., 2005). Assim a formação de PUFAs em C₂₀ poderá não ser o precursor dos PUFAs em C₂₂ (Bergé & Barnathan, 2005).

O funcionamento de um sistema PKS ajuda a explicar porque é que muitos organismos produtores de DHA não possuem grupos acilo de ácido gordo de tamanho intermédio entre os seus lípidos (Ratledge, 2004). O sistema PKS parece funcionar como um tubo de escoamento em que os blocos de construção (acetil e malonil-CoA) entram num lado e o produto surge no outro. Os intermediários estão, aparentemente, demasiado ligados para serem libertados como ésteres livres da CoA e ficarem disponíveis para a síntese de triacilgliceróis (Ratledge, 2004).

O protista marinho *Schizochytrium*, também identificado como tendo potencial para a produção comercial de DHA, pertence à família Thraustochytrid, pode acumular grandes quantidades de triacilgliceróis ricos em 22:6n-3 e 22:5n-6 (Barclay et al., 2005). Contudo, estudos bioquímicos indicam que a síntese de PUFAs não envolve dessaturases nem elongases neste eucarionte (Wallis et al., 2002) tendo sido recentemente demonstrado que utiliza um sistema PKS similar ao utilizado pelos

procariontes para a síntese de PUFAs (Metz et al., 2001; Ratledge, 2004; Barclay et al., 2005), cujo esquema se apresenta na fig. 7.

No que respeita à síntese dos ácidos gordos com 14 e 16 átomos de carbono, não está esclarecido se a mesma ocorre através de um sistema sintetase de ácidos gordos convencional ou se estes ácidos gordos também são produzidos pelo sistema PKS (Ratledge, 2004).

Schizochytrium foi apenas o primeiro microrganismo eucarionte onde foi identificado um sistema PKS. Posteriormente verificou-se que uma via similar estava presente em *Ulkenia* sp., um protista eucarionte pertencente à ordem Thraustochytriales do filo Labyrinthulomycota e identificado como promissor para a produção de DHA (Kiy et al., 2005).

O mecanismo de síntese do DHA por *Cryptocodinium cohnii* é desconhecido (de Swaaf et al., 2003a). Apesar de nenhum trabalho ter sido publicado até à data acerca do mecanismo de síntese de DHA por *Cryptocodinium cohnii* é de todo o interesse esclarecer se utiliza um sistema PKS como *Schizochytrium*. Se for esse o caso, fica explicada a dificuldade em identificar dessaturases, como as dos eucariontes, neste organismo (Ratledge, 2004).

A extensão da insaturação dos ácidos gordos individuais é regulada genética e ambientalmente sendo a temperatura o factor ambiental crítico que regula a insaturação (Murata & Wada, 1995; Los & Murata, 1998). Em resposta a um decréscimo da temperatura ambiente a maioria dos organismos poiquilotérmicos, incluindo cianobactérias e bactérias, aumentam o teor de ácidos gordos insaturados mantendo a fluidez apropriada dos lípidos de membrana, apesar da temperatura ambiente (Hazel, 1995). Esta aclimatização é denominada aclimatização homeoviscosa (Sakamoto & Murata, 2002).

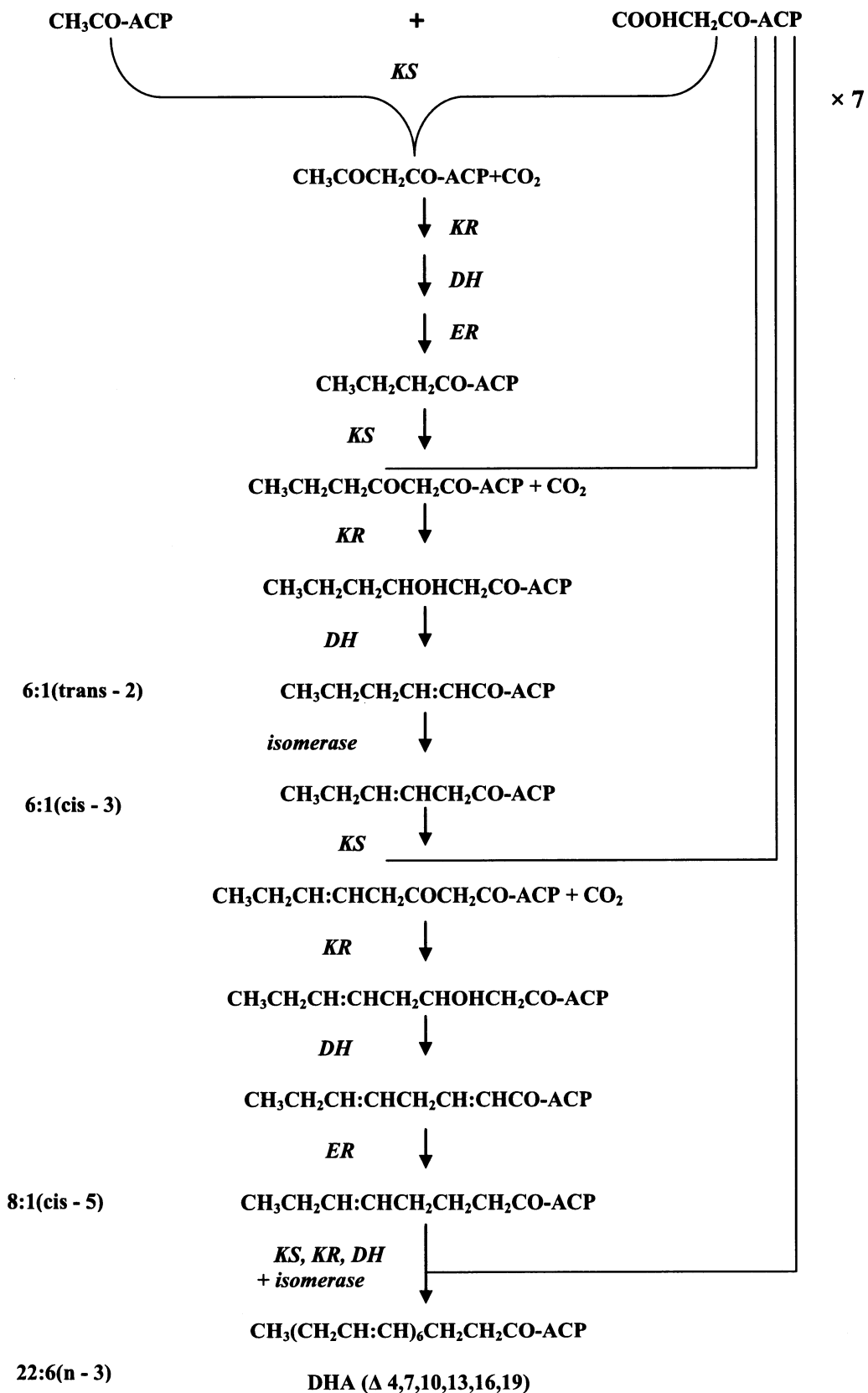


Figura 7 – Esquema proposto para a síntese de DHA via sistema PKS, em *Schizochytrium* sp. (Ratledge, 2004).

2.2.2 Funções e metabolismo

Os ácidos gordos poli-insaturados são componentes essenciais dos eucariontes superiores que conferem fluidez, flexibilidade e permeabilidade selectiva às membranas celulares (Wallis et al., 2002). Os ácidos gordos poli-insaturados afectam muitos processos celulares e fisiológicos quer nas plantas quer nos animais incluindo a adaptação e sobrevivência ao frio (Wada et al., 1990; Miquel et al., 1993; Morgan-Kiss et al., 2006), a modulação de canais iónicos (Wang, 2003; Rychkov et al., 2005), a endocitose/exocitose (Schmidt et al., 1999), a formação de pólen, a defesa contra os patogéneos, o desenvolvimento de cloroplastos nas plantas (Wallis & Browse, 2002) e a actividade de enzimas associadas a membranas sensíveis às propriedades biofísicas dos lípidos de membrana (Goldberg & Zidovetzki, 1997; Morgan-Kiss et al., 2006).

Os PUFAs também controlam a expressão de certos genes e, desta forma, afectam processos como a biossíntese de ácidos gordos (Certik & Shimizu, 1999) e o transporte de colesterol no organismo (Certik & Shimizu, 1999; Bérard et al., 2004). Além disso, os PUFAs e os seus metabolitos podem actuar ao nível do núcleo, em conjugação com receptores nucleares e factores de transcrição, e afectar a transcrição de vários genes (Samph & Ntambi, 2005). Os PUFAs regulam a actividade e a abundância de quatro famílias de factores de transcrição: receptores activados por proliferação celular (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor* – PPAR) (alfa, beta e gama), receptores X do fígado (*Liver X Receptors* – LXRs) (alfa e beta), factor nuclear hepático-4 (*Hepatic Nuclear Factor-4* – HNF-4) e proteínas de ligação de elementos reguladores alfa e esterol (*alpha and Sterol Regulatory Element Binding Proteins* – SREBPs) (1 e 2) e estes factores de transcrição desempenham um papel fundamental no metabolismo dos hidratos de carbono, ácidos gordos, triacilgliceróis, colesterol e ácidos biliares (Jump, 2002).

Nos mamíferos, o metabolismo dos ácidos gordos de cadeia longa com 20 átomos de carbono por oxigenases origina uma variedade de moléculas de vida curta, conhecidas como eicosanóides tais como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (Wallis et al., 2002; Bergé & Barnathan, 2005) (fig.8).

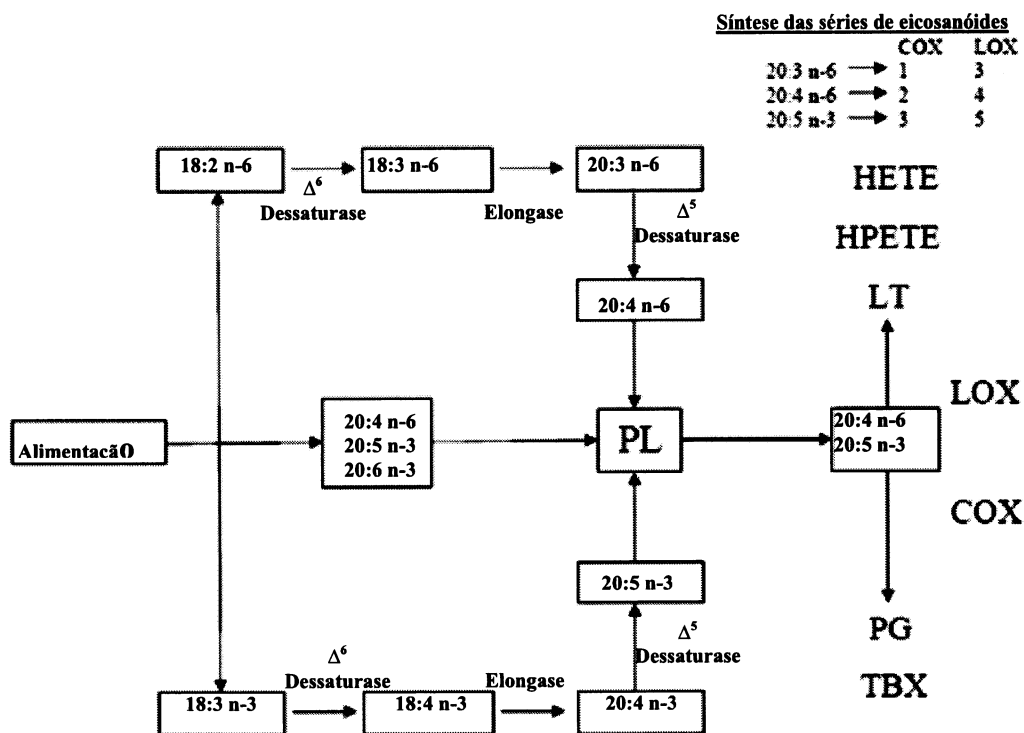


Figura 8 – Biossíntese de eicosanóides a partir dos ácidos gordos (Bérge & Barnathan, 2005). Abreviaturas: PL, fosfolípidos; PLA₂, fosfolipase A₂; COX, ciclooxigenase; LOX, lipooxigenase; PG, prostaglandinas; TBX, tromboxanos; HETE, ácidos hidroxieicosatetraenóicos; HPETE, ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóicos; LT, leucotrienos. Os lípidos obtidos através da alimentação fornecem quer os ácidos gordos precursores directos para as vias COX/LOX, quer os ácidos gordos 18:2(n-6) e 18:3(n-3) que têm de ser alongados e insaturados antes de serem convertidos em eicosanóides.

Os eicosanóides actuam localmente nas células onde são produzidos ou nas células vizinhas (Canon, 1984; Hoffman & Dunham, 1995) e podem causar efeitos fisiológicos profundos mesmo em pequenas concentrações (King, 2009).

Os eicosanóides ligam-se a uma proteína-G acoplada a receptores e sinalizam respostas celulares e modulam processos biológicos como a febre, a inflamação, a vasodilatação, a pressão arterial, a dor (Funck, 2001; Wallis et al., 2002), a agregação plaquetária, a hemorragia, a vasoconstrição e a resposta imunitária (Benatti et al., 2004).

Podendo os substratos para a síntese de eicosanóides ser obtidos directamente, através da alimentação, ou resultar da síntese endógena (por dessaturação/elongação dos ácidos 18:2n-6 e 18:3n-3) (fig.7), há que considerar estes dois aspectos como determinantes da disponibilidade de PUFAs para a síntese de eicosanóides.

Como já foi referido, nos mamíferos os ácidos gordos 18:2 ω -6 (LA) e 18:3 ω -3 (ALA) não são interconvertíveis e competem pelos mesmos sistemas enzimáticos (Simopoulos, 1999a; Haag, 2003; Calder & Grimble, 2002; Calder, 2004), as dessaturases Δ -6 e Δ -5 (Bergé & Barnathan, 2005; Wen & Chen, 2005). Contudo, o ALA é um inibidor mais forte do metabolismo dos ácidos gordos ω -6 que o Lado metabolismo dos ácidos gordos ω -3, tendo-se constatado que é necessário dez vezes mais LA para obter uma inibição equivalente do metabolismo dos ácidos gordos ω -3 (Holman, 1998). De acordo com Simopoulos (1999a, 2000) a ingestão de uma razão LA:ALA, inferior ou igual a 4:1 é crucial para um metabolismo normal (elongação de 11 g de ALA a EPA), uma vez que o EPA é biologicamente mais activo que o ALA e elevadas quantidades de LA diminuem a conversão de ALA em EPA.

Embora as dessaturases Δ -6 e Δ -5 possuam maior afinidade para os ácidos gordos ω -3 do que para os ácidos gordos ω -6, uma alimentação constituída maioritariamente por ácidos gordos ω -6 pode inibir significativamente a formação endógena de ácidos gordos ω -3 no geral e de EPA e DHA em particular (Valenzuela & Nieto, 2001; Ruxton et al., 2005).

Por outro lado, a síntese endógena de LCPUFAs pode não ser apenas determinada por mecanismos de competição directa, pode também ser determinada pela regulação da actividade e abundância das enzimas de insaturação e elongação ao nível da expressão dos genes correspondentes (Benatti et al., 2004).

O AA e o EPA competem ao nível das ciclooxigenases e lipooxigenases para a síntese de prostaglandinas e leucotrienos com propriedades antagónicas (Simopoulos, 2002a), (fig. 9). O AA é o precursor da 2ª série de prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) e de leucotrienos da 4ª série com características pró-inflamatórias. Enquanto o EPA e o DHA dão origem a prostanóides da 3ª série e a leucotrienos da 5ª série com características anti-inflamatórias (Simopoulos, 1991).

Como os eicosanóides derivados do AA são biologicamente activos em quantidades muito pequenas, se eles se formarem em grandes quantidades, irão contribuir para a formação de trombos e ateromas, desencadear reacções alérgicas e inflamatórias; e contribuir para a proliferação celular, sobretudo nos indivíduos mais susceptíveis (Simopoulos, 1999a; 2000; 2001a; 2008a,b; Benatti et al., 2004).

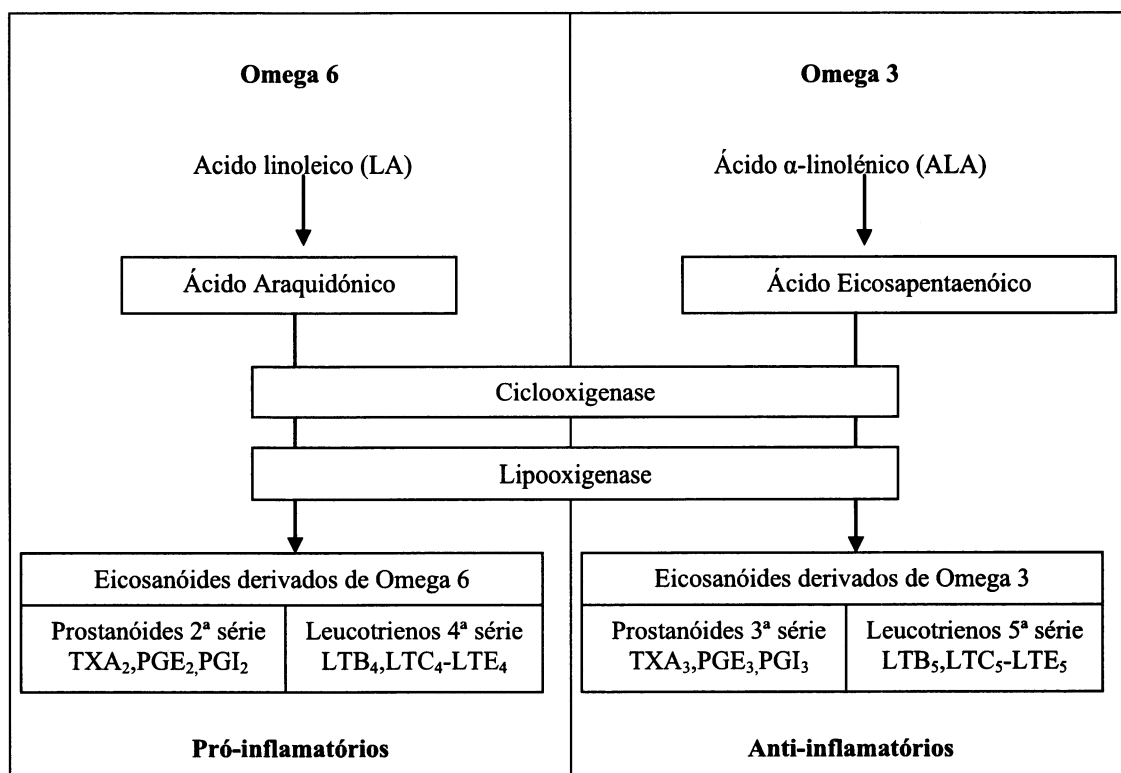


Figura 9 – Síntese de eicosanóides a partir dos ácidos gordos ómega 6 e ómega 3. Os ácidos araquidónico e eicosapentaenóico competem pelas enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase para conversão em eicosanóides. Os eicosanóides derivados do ácido araquidónico são pró-inflamatórios enquanto os derivados do ácido eicosapentaenóico são anti-inflamatórios (Din et al., 2004).

Os PUFAs ω -3 de cadeia longa actuam directamente (e.g. substituindo o AA como substrato para a síntese de eicosanóides e inibindo o metabolismo deste ácido gordo) ou indirectamente (e.g. alterando a expressão de genes inflamatórios, actuando ao nível da activação dos factores de transcrição) (Calder, 2006; Raghu & Venkatesan, 2008).

Os PUFAs ω -3 de cadeia longa, EPA e DHA, também dão origem a uma família de mediadores anti-inflamatórios com função imunoreguladora, designados resolvinas, de “resolution phase interaction products” (Serhan et al., 2004; Calder, 2006; Serhan, 2006; Raghu & Venkatesan, 2008). Estes, directa ou indirectamente, suprimem a actividade de factores de transcrição nuclear, tais como o factor nuclear kappa B, NF κ B, e reduzem a produção de enzimas e citocinas pró-inflamatórias, incluindo COX-2, factor de necrose tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-1 β (Kang & Weylandt, 2008).

Ao contrário de outros compostos identificados anteriormente, formados a partir dos ácidos gordos ω -3 e similares em estrutura a eicosanóides mas menos potentes e desprovidos de acção biológica, as resolvinas, docosatrienos e neuroprotectinas suscitam acções biológicas potentes *in vitro* e *in vivo* (Serhan et al., 2004).

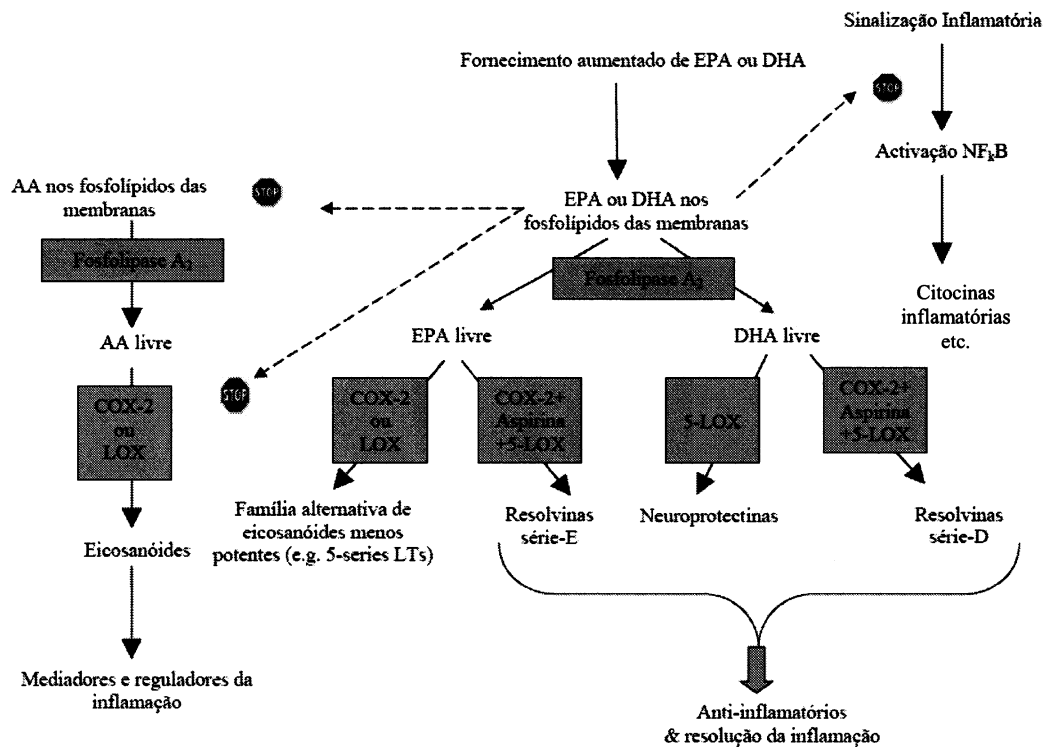


Figura 10 – Mecanismos pelos quais os PUFAs ω -3 exercem os seus efeitos anti-inflamatórios (Calder, 2006; 2008). Um aumento de EPA e/ou DHA resulta na incorporação destes ácidos gordos nas membranas das células inflamatórias, em substituição de parte do AA. O EPA e o DHA também inibem o metabolismo do AA por ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX). Assim, o EPA e o DHA diminuem a produção de eicosanóides derivados do AA. O metabolismo do EPA por COX-2 e 5-LOX dá origem a eicosanóides tipicamente menos potentes que os derivados do AA. O metabolismo do DHA por 5-LOX dá origem a neuroprotectinas anti-inflamatórias. O metabolismo do EPA e do DHA por COX-2 e 5-LOX na presença de aspirina dá origem a resolvinas anti-inflamatórias. O EPA e o DHA também inibem a via de sinalização que conduz à activação do factor nuclear kappa B (Nuclear Factor Kappa B -NFκB), um factor de transcrição que induz a expressão de genes inflamatórios incluindo aqueles que codificam citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e COX-2.

As várias funções desempenhadas pelos PUFAs indicam que os mesmos são necessários em todos os órgãos e, como tal, não é de surpreender que deficiências em

PUFAs conduzam a anomalias na pele, sistemas nervoso, imunitário, inflamatório, cardiovascular, endócrino, renal, respiratório e reprodutor (Certik & Shimizu, 1999).

Pensa-se que muitas doenças se devem a disfunções no sistema de eicosanóides, as quais, por sua vez, estão relacionadas com uma ingestão inadequada de alimentos e/ou com o metabolismo deficiente dos ácidos gordos insaturados (Bergé & Barnathan, 2005).

Uma vez que a produção das várias classes de eicosanóides depende, em parte, da disponibilidade de ácidos gordos poli-insaturados precursores nos fosfolípidos da membrana, a modulação dos ácidos gordos poli-insaturados surge como um alvo potencial para produtos farmacêuticos e nutracêuticos (Wallis et al., 2002; Napier, 2002; Bergé & Barnathan, 2005).

2.2.3 Benefícios para a saúde

Embora os ácidos gordos poli-insaturados façam parte da alimentação humana há 2-4 milhões de anos (Leaf & Weber, 1987; Leaf et al., 1999), os PUFAs da família ω -6 encontram-se actualmente em excesso relativamente aos da família ω -3, na alimentação das populações das sociedades ocidentais situando-se a ingestão dos segundos em valores muito inferiores aos considerados óptimos (Surette, 2008). Por esta razão, neste ponto serão referidos sobretudo, os benefícios para a saúde dos PUFAs ω -3.

De entre os PUFAs ω -6 apenas merece destaque o ácido araquidónico que, conjuntamente com o DHA, é um dos constituintes principais dos fosfolípidos das células cerebrais (Heude et al., 2003) e desempenha um papel importante no desenvolvimento infantil (Koletzko & Braun, 1991). Atendendo a este facto, foi recomendado que a alimentação de bebés não amamentados, deveria ser suplementada com ácido araquidónico (Carlson et al., 1993; Boswell et al., 1996), recomendação que foi implementada em Fevereiro de 2002 (Wynn et al., 2005).

As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte nas sociedades ocidentais (Horrocks & Yeo, 1999; Heron, 2007; Torrejon et al., 2007; Kung et al., 2008) e, como tal, a investigação das suas causas, prevenção e tratamento é absolutamente prioritária.

Está bem documentado que as populações com elevado consumo de peixe e óleo de peixe apresentam uma incidência mais baixa de doenças cardiovasculares tais como enfarte do miocárdio, arritmia, aterosclerose e hipertensão (Bang et al., 1976; Newman et al., 1993; Horrocks & Yeo, 1999; Calder, 2004) e que os componentes protectores responsáveis por este facto são os ácidos gordos poli-insaturados EPA e DHA (Hirafuji et al., 2003; Leaf et al., 2005) presentes em elevadas quantidades na alimentação dessas populações. Assim, tal como seria de esperar, o efeito protector dos alimentos ricos em PUFAs ω -3, ou dos seus equivalentes farmacológicos, tem sido objecto de estudo nos últimos trinta anos.

Estudos clínicos e experiências em animais confirmaram o efeito protector do peixe e/ou dos PUFAs ω -3 contra as doenças cardiovasculares (Albert et al., 1998; Zhang et al., 1999; Rissanen et al., 2000; Kang & Leaf, 2000; Albert et al., 2002; Hu et al., 2001; Mozaffarian et al., 2008) e estudos epidemiológicos, realizados em vários países, indicam que a ingestão de peixe, mesmo em quantidades moderadas, confere alguma protecção contra essas doenças (Kromhout et al., 1985; Dickinson, 2002), mesmo no caso de pessoas idosas (Kromhout et al., 1995).

Vários ensaios clínicos confirmaram a capacidade dos óleos de peixe na prevenção da morte por ataque cardíaco súbito, quer em voluntários presumivelmente saudáveis (Kromhout et al., 1985; Albert et al., 1998), quer em pacientes que já haviam sofrido um primeiro ataque cardíaco (Burr et al., 1989; Christensen et al., 1996; GISSI-Prevenzione Investigators, 1999; Burr, 2001; Holub & Holub, 2004). O EPA e DHA parecem reduzir também a mortalidade entre pacientes que tenham sobrevivido a um primeiro ataque cardíaco (Marchioli, 2001; Marchioli et al., 2001; Marchioli et al., 2002) e entre os idosos (Lemaitre et al., 2003; Harris, 2003).

Apesar da presença de mercúrio no peixe poder atenuar o efeito protector dos ácidos gordos contidos neste alimento (Rissanen et al., 2000) e estar associada a um aumento do risco cardiovascular (Salonen et al., 1995; Mozaffarian & Rimm 2006) numa análise dos riscos e benefícios do consumo de peixe para a saúde humana, concluíram que, no caso dos adultos, os benefícios do consumo são superiores aos potenciais riscos e que, para mulheres em idade fértil, o consumo moderado de peixe, excluindo algumas espécies, também apresenta mais benefícios do que riscos.

O consumo de LCPUFAs ω -3 pode proteger contra o processo patológico que conduz à doença cardiovascular (a aterosclerose) e contra o processo que, em última análise causa a morte por acidente cardio ou cérebro-vascular (Calder, 2004). Os

resultados dos ensaios de intervenção são consistentes e sugerem que os PUFAs ω -3 reduzem os riscos de doenças cardiovasculares, provavelmente através de múltiplos mecanismos: baixando a concentração de triacilgliceróis no sangue, melhorando a razão LDL:HDL, diminuindo as arritmias no músculo cardíaco, melhorando a estabilidade da placa aterosclerótica, evitando a formação de trombos e reduzindo a activação do endotélio (Ruxton et al., 2005).

Actualmente, embora a suplementação farmacológica de PUFAs ω -3 não seja recomendada na prevenção primária da doença cardiovascular (Kandasamy et al., 2008), o aumento da sua ingestão através da alimentação é encorajado (Wang et al., 2006; Kandasamy et al., 2008).

A segunda causa de morte nas sociedades ocidentais é o cancro (Kung et al., 2008) e existem evidências (de estudos *in vitro* e em animais) que indicam que os ácidos gordos ω -3, sobretudo o EPA e DHA presentes no peixe e óleo de peixe, inibem a carcinogenese (Larson et al., 2004).

Estudos epidemiológicos e experiências em animais indicam que os ácidos gordos ω -3 exercem um efeito protector contra alguns cancros nomeadamente da mama, cólon e próstata (Bartsch et al., 1999; Simopoulos, 2003a; Norrish et al., 1999; Yang et al., 2003). Estudos em pacientes com cancro da mama indicam que os ácidos gordos ω -3 em geral e o DHA em particular, aumentam a resposta a agentes químico-preventivos (Simopoulos, 2003a). Em doentes com cancro colorectal, o EPA e o DHA diminuem a proliferação de células e modulam favoravelmente o balanço entre a proliferação e apoptose das células cancerígenas (Simopoulos, 2003a). Níveis elevados de PUFAs ω -3 de cadeia longa e de ácido linoleico no sangue estão associados a uma redução do risco de cancro da próstata (Chavarro et al., 2007).

No entanto, MacLean e colaboradores (2006), num artigo de revisão dos estudos de coorte sobre os efeitos dos ácidos gordos omega-3, consideram que os mesmos não permitam estabelecer correlações significativas entre o consumo de ácidos gordos omega-3 e a incidência de cancro.

Os ácidos gordos ω -3 podem também actuar positivamente contra efeitos do cancro tais como caquexia (perda anormal de peso) (Barber et al., 1999; Jho et al., 2004; Jatoi, 2005) ou taxa de sobrevivência em fase terminal (Gogos et al., 1998).

Têm sido propostos vários mecanismos através dos quais os PUFAs ω -3 podem modificar o processo de carcinogénese nomeadamente: suprimindo a biossíntese de eicosanóides derivados do AA; afectando a actividade dos factores de transcrição, a

expressão genética e as vias de transdução de sinais; alterando o metabolismo do estrogénio; aumentando ou diminuindo a produção de radicais livres e espécies reactivas com oxigénio; e afectando a sensibilidade à insulina e a fluidez da membrana (Larson et al., 2004).

Estudos clínicos e em animais indicam que os ácidos gordos ω -3 modificam as reacções inflamatórias e imunitárias e podem actuar como agentes terapêuticos para doenças inflamatórias e auto-imunes (Simopoulos, 2002a). Pensa-se que a composição das células imunitárias em ácidos gordos pode influenciar a inflamação e a imunidade através de mecanismos como a fluidez da membrana plasmática, ou de regiões dessa membrana, a formação de moléculas que regulam as vias de transdução de sinais e a produção de eicosanóides (Calder & Grimble, 2002). A ligação entre os ácidos gordos e a função imunitária faz-se através dos eicosanóides e estes estão envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória e imune (Calder & Grimble, 2002).

Um consumo mínimo de 3 g de EPA mais DHA está associado a melhorias na artrite reumatóide, melhorias essas acompanhadas de uma diminuição da produção de interleucina 1 β (IL-1 β) e de uma redução da libertação de leucotrieno B₄, dois mediadores da inflamação, relacionados com os episódios inflamatórios desta doença (Kremer, 2000).

A eficácia dos óleos de peixe tem sido estudada noutras doenças inflamatórias tais como doença de Crohn's (Belluzzi et al., 2000; MacDonald, 2006), colite ulcerosa (Belluzzi et al., 2000), psoríase (Mayser et al., 1998), lúpus (Walton et al., 1991), esclerose múltipla (Bates et al., 1989), fibrose quística (Kurlandsky et al., 1994) e asma (Mickleborough et al., 2006). Embora estejam descritos benefícios para cada uma destas doenças, as evidências apenas são consistentes no caso da artrite reumatóide (Calder & Grimble, 2002; Ruxton, 2005).

Vários estudos epidemiológicos mostraram que uma dieta rica em ácido linoleico e pobre em EPA e DHA estava associada a um défice cognitivo e a um risco acrescido de demência (Bergé & Barnathan, 2005).

O consumo moderado de peixe (ingestão de PUFAs ω -3) tem sido relacionado com a redução do risco de demência e, em particular com a doença de Alzheimer (Kalmijn et al., 1997; 2004; Barberger-Gateau et al., 2002; Morris et al., 2003) sendo o decréscimo do DHA no cérebro associado ao declínio cognitivo durante o

envelhecimento e aos primeiros sintomas da doença de Alzheimer (Horrocks & Yeo, 1999).

Heude et al. (2003) mostraram uma relação inversa entre o teor de PUFAs omega-3 nas membranas dos eritrócitos e o declínio cognitivo. Sabe-se que o EPA e, sobretudo, o DHA ajudam a manter as membranas das células do cérebro fluidas enquanto os ácidos gordos ω -6 tendem a torná-las rígidas pelo que os autores acreditam que isso e os efeitos anti-inflamatórios do EPA e do DHA ajudam a preservar a função cognitiva. Van Gelder e colaboradores (2007) no Zutphen Elderly Study encontraram uma relação linear entre a ingestão de DHA mais EPA e a prevenção do declínio cognitivo tendo concluído que uma ingestão de aproximadamente 380 mg EPA mais DHA, por dia e por adulto, parece prevenir o declínio cognitivo. Schaefer et al. (2006) mostraram que o aumento dos níveis de DHA nos fosfolípidos do plasma estava associado a uma redução significativa (47%) do risco de desenvolver demência.

Estima-se que entre 20-40% da população actualmente com mais de 85 anos possa sofrer de doença de Alzheimer (Connor & Connor, 2007) e sabe-se que o cérebro dos doentes de Alzheimer possui um conteúdo mais baixo de DHA, sobretudo na massa cinzenta do lobo frontal e no hipocampo que o cérebro de pessoas que não sofrem da doença (Söderberg et al., 1991; Connor & Connor, 2007). Schaefer et al. (2006) descreveram uma redução de 50% no risco de doença de Alzheimer associada ao consumo de mais de duas refeições de peixe por semana.

As sociedades que tradicionalmente consomem quantidades elevadas de peixe e ácidos gordos ω -3 apresentam taxas mais baixas de depressão (Hibbeln & Salem, 1995) e doença bipolar (Noaghiul & Hibbeln, 2003). Além disso, está bem estabelecida uma correlação positiva entre depressão e doenças cardiovasculares (Hibbeln & Salem 1995) as quais, por sua vez, estão inversamente relacionadas com o consumo de PUFAs ω -3.

Há ainda estudos que apontam para uma relação entre os baixos níveis de ácidos ω -3 e a hiperactividade nas crianças, tendo-se observado valores anormalmente baixos de DHA em crianças com défice de atenção/hiperactividade (Mitchell et al., 1987) e também em adolescentes e adultos com défice de atenção/hiperactividade (Colter et al., 2008; Young et al., 2005). Burgess et al. (2000) constataram que as crianças hiperactivas, regra geral, não foram amamentadas e consideraram factores como o baixo aporte dos ácidos linoleico e α -linolénico, a conversão deficiente destes ácidos gordos em ácidos gordos de cadeia longa e o metabolismo aumentado dos ácidos gordos de cadeia longa como explicação para os baixos níveis de PUFAs descritos. Para além da

hiperactividade, outras doenças como a dislexia (que se traduz em dificuldades em aprender a ler e escrever) e a dispraxia (problemas de coordenação e controlo muscular) apresentam em comum deficiências em PUFAs ω -3 (Stordy, 2000).

Os níveis de PUFAs ω -3 na mãe durante a gravidez determinam os níveis presentes no feto em desenvolvimento. Têm sido descritos vários estudos, de observação e intervenção, sobre a influência dos ácidos gordos ω -3 na duração da gestação (Olsen & Secher, 1990; Olsen et al., 1992), tamanho e peso do bebé à nascença (Olsen et al., 1992), pré-eclâmpsia (D'Almeida et al., 1992), depressão pós-parto (de Vriese et al., 2003) e desenvolvimento neurológico e visual do bebé (Innis et al., 2001; Helland et al., 2003; Birch et al., 2005). Contudo, não existe consenso quanto ao efeito dos PUFAs ω -3 em cada um destes aspectos (Jensen, 2006). Os resultados disponíveis sugerem que um aumento da ingestão de PUFAs ω -3 durante a gravidez pode diminuir o risco de nascimentos prematuros e, possivelmente, beneficiar o desenvolvimento neurológico dos bebés (Jensen, 2006). Num estudo recente, Judge et al. (2007a) concluíram que a suplementação com DHA durante a gestação melhorou a acuidade visual dos bebés aos 4 meses embora não se registassem diferenças em relação ao grupo de controlo aos 6 meses. Com base nestes resultados os autores concluíram que o DHA suplementado desempenhou um papel na maturação do sistema visual. Noutro estudo Judge et al. (2007b) concluíram que, aos 9 meses, os bebés que beneficiaram de suplementação com DHA durante a gestação, obtinham melhores resultados em tarefas de resolução de problemas (comparativamente ao grupo de controlo).

2.2.4 Nutrição: importância da razão ácidos gordos ω -6/ ω -3

A saúde dos indivíduos e da população em geral é determinada por factores genéticos e ambientais tendo-se demonstrado recentemente, utilizando técnicas de biologia molecular, que os factores genéticos determinam a susceptibilidade à doença e que os factores ambientais determinam aqueles, de entre os indivíduos susceptíveis, que serão afectados (Simopoulos, 2001a,d; Simopoulos 2006b; Simopoulos, 2008a,b).

Entre os factores ambientais, destaca-se pela sua importância a nutrição. Sabe-se que os ácidos gordos ω -6 e ω -3 fazem parte da nossa alimentação desde os primórdios da vida humana e que a nossa base genética foi estabelecida à mais de 10000 anos, quando a dieta dos nossos ancestrais era constituída por quantidades aproximadamente

iguais de cada uma destas famílias de ácidos gordos (Simopoulos, 2001d). Como a taxa de mutação espontânea do DNA nuclear está estimada em 0,5% por milhão de anos isso significa que, nos últimos 10000 anos, houve tempo para alterações mínimas nos nossos genes, talvez 0,005% (Simopoulos, 2004). De facto, os nossos genes são muito semelhantes aos dos nossos ancestrais do período Paleolítico, 40000 anos atrás, o mesmo não se podendo dizer dos nossos hábitos alimentares. Nos últimos 100-150 anos a relação entre ácidos gordos ω -6 e ω -3 na alimentação humana foi completamente alterada com o desenvolvimento da agricultura e da pecuária (Simopoulos, 1991; 1999b). Alterações na dieta e nos métodos de preparação dos alimentos (Newton, 1998) fizeram com que, actualmente nas sociedades ocidentais, a razão PUFAs ω -6/ ω -3 varie de 15-20:1, em vez dos tradicionais 1-2:1 (Simopoulos, 2001c,d; 2008b).

Sabe-se que os ácidos gordos ω -6 e ω -3 afectam o metabolismo dos eicosanóides, a expressão genética e a comunicação intercelular célula-a-célula (Simopoulos, 2000) e que as duas famílias de ácidos gordos se distinguem pelo facto de serem metabólica e funcionalmente distintas e por desempenharem funções fisiológicas opostas (Simopoulos, 1991; 2000). Assim, não é de surpreender que a relação entre ácidos gordos ω -6 e ω -3 seja importante para a homeostase e para um desenvolvimento normal (Simopoulos, 1991) e que uma relação inadequada entre estes ácidos gordos seja responsável por muitas das doenças que afectam actualmente a humanidade. Uma ingestão adequada de EPA/AA pode prevenir disfunções no sistema de eicosanóides e ser eficaz no tratamento de doenças e desordens metabólicas (Gill & Valivety, 1997)

O aumento da ingestão de ácidos gordos ω -6, característico das sociedades ocidentais, desregula a razão PUFAs ω -6/ ω -3 e conduz a uma sobreprodução de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias (Simopoulos, 2002a) alterando o estado fisiológico para um estado pró-trombótico, pró-constritivo e pró-inflamatório. Muitas doenças crónicas, doenças cardio e cérebro-vasculares, diabetes, cancro, obesidade, doenças do sistema imunitário, artrite reumatóide e depressão estão relacionadas com um aumento da produção do tromboxano A₂ (TX A₂), leucotrieno B₄ (LT B₄), interleucina 1 (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), factor de necrose tumoral (TNF) e proteína-C reactiva (Simopoulos, 2003b). Todos estes factores aumentam com o aumento da ingestão de ácidos gordos ω -6 e diminuem com a ingestão de ácidos gordos ω -3 (Simopoulos, 2003b; Bergé & Barnathan, 2005).

Actualmente a importância dos ácidos gordos ω -3 na alimentação e a necessidade de retornar a razões mais fisiológicas entre a ingestão de ácidos gordos ω -6 e ω -3 (cerca de 1-4/1) são inquestionáveis (Simopoulos, 2002a).

Embora não existam dados que permitam estabelecer a dose diária recomendada (*Dietary Reference Intakes* – DRI) de PUFA ω -3 existem evidências científicas que permitem fazer recomendações acerca da sua ingestão adequada (*Adequate Intakes* – AI). A designação “ingestão adequada” refere-se à ingestão diária de um nutriente considerada adequada e é determinada com base na ingestão média desse nutriente (observada, determinada experimentalmente, ou estimada) por um grupo, ou grupos, de indivíduos saudáveis (Simopoulos et al., 1999).

O Canadá foi o primeiro país a estabelecer recomendações em termos de consumo de PUFA ω -3. Em 1990 a *Health and Welfare* do Canadá recomendava uma ingestão mínima de ácidos gordos poli-insaturados ω -3 de 0,5% do total de energia, na forma de ALA (Holub, 2006). Estas recomendações foram depois aplicadas e modificadas pelo *Food and Nutrition Board* dos Estados Unidos que estabeleceu as recomendações apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Ingestão adequada recomendada de ácidos gordos ω -3 (Food and Nutrition Board, USA, 2002).

| Fase da vida | Idade | Masculino (g/dia) | Feminino (g/dia) |
|--------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Bebés | 0-6 meses | 0,5 | 0,5 |
| Bebes | 7-12 meses | 0,5 | 0,5 |
| Crianças | 1-3 anos | 0,7 | 0,7 |
| Crianças | 4-8 anos | 0,9 | 0,9 |
| Crianças | 9-13 anos | 1,2 | 1,2 |
| Crianças | 14-18 anos | 1,6 | 1,1 |
| Adultos | maiores de 18anos | 1,6 | 1,1 |
| Gravidez | qualquer idade | | 1,4 |
| Aleitamento | qualquer idade | | 1,3 |

Nota: Até 10% dos valores de ingestão Adequada dos ácidos gordos ω -3 podem ser na forma de DHA mais EPA.

Em 1992, a *British Nutrition Foundation* recomendava a obtenção de 1 % de energia a partir de ALA e de 0,5 % de energia a partir de EPA+DHA (Roche, 1999).

Em 1999 um grupo de trabalho sobre essencialidade e recomendações para ingestão adequada de ácidos gordos ω -6 e ω -3, publicou recomendações acerca da percentagem de PUFA's na alimentação de adultos (Tabela 5), nas formulações infantis e no leite materno (Tabela 6) e também recomendou uma ingestão mínima de 300 mg DHA/dia durante a gravidez.

Tabela 5 – Ingestão adequada de diferentes ácidos gordos, recomendada para adultos (Simopoulos et al., 1999).

| Ácido Gordo | g/dia (2000 kcal/dia) | % Energia |
|----------------------------|-----------------------|-----------|
| LA | 4,44 | 2,0 |
| (limite superior) | 6,67 | 3,0 |
| ALA | 2,22 | 1,0 |
| DHA+EPA | 0,65 | 0,3 |
| DHA (limite inferior) | 0,22 | 0,1 |
| EPA (limite inferior) | 0,22 | 0,1 |
| Trans FA (limite superior) | 2,00 | 1,0 |
| SAT (limite superior) | | < 8,0 |

Tabela 6 – Ingestão adequada de diferentes ácidos gordos, recomendada para alimentação/formulações infantis (Simopoulos et al., 1999).

| Ácido Gordo | % dos Ácidos gordos |
|-----------------------|---------------------|
| LA | 10,00 |
| ALA | 1,5 |
| AA | 0,5 |
| DHA | 0,35 |
| EPA (limite superior) | < 0,10 |

A *American Heart Association* recomendou em 2000, o consumo de duas refeições de peixe por semana (que correspondem a 250-300 mg/dia EPA mais DHA) para indivíduos saudáveis (Krauss et al., 2000; Kris-Etherton et al., 2002; Kris-Etherton et al., 2003) e uma ingestão de 900 mg diárias de DHA+EPA para indivíduos com doenças coronárias diagnosticadas (Krauss et al., 2000) e uma suplementação de 2-4 g de EPA mais DHA por dia (sob vigilância médica) para pacientes com hipertrigliceridemia (Kris-Etherton et al., 2003).

A *World Health Organization* recomendou em 2003 uma ingestão de ácidos gordos ω -3 de 1-2% de energia (World Health Organization, Food And Agriculture Organization, 2002). Contudo, a Sociedade Japonesa para a Nutrição de Lípidos recomenda que a ingestão de LA seja reduzida a 3-4% de energia, numa população cujo consumo médio de ácidos gordos ω -3 é de 2,6 g/dia e inclui cerca de 1 g/dia de EPA+DHA (Hamazaki & Okuyama, 2003).

Em consonância, em Julho de 2004, a *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids* (ISSFAL) recomenda uma ingestão de ácido linoleico de 2% de energia e reconhece que pode existir um limite superior para a ingestão deste ácido gordo. Recomenda uma ingestão de ALA de 0,7 % de energia e de um mínimo de 500 mg/dia de DHA+EPA (ISSFAL, 2004).

Outras organizações e grupos de profissionais, fizeram recomendações acerca do consumo de peixe ou de EPA e DHA (Gebauer et al., 2006). Algumas recomendações foram feitas em termos de razão ácidos gordos ω -6/ ω -3. Em França (2001) recomendava-se a ingestão de uma razão ω -6/ ω -3 de 5:1 (Martin, 2001) e o Japão alterou a recomendação de uma razão ω -6/ ω -3 inferior a 4:1 para inferior a 2:1 (Kris-Etherton et al., 2000). Contudo, as indicações em termos de razões não são muito úteis porque os diferentes ácidos gordos possuem funções fisiológicas distintas e, os efeitos do EPA/DHA não podem ser reproduzidos pelo ALA (Trautwein, 2001).

Para a prevenção de doenças a razão ω -6/ ω -3 recomendada é ainda mais baixa e varia com a doença em questão (Simopoulos, 2008b). Na prevenção primária de doenças cardiovasculares a razão ω -6/ ω -3 deve ser de 1:1 (Simopoulos, 2001a) e, na prevenção secundária, uma razão de 4:1 está associada a um decréscimo de 70% da mortalidade (Simopoulos, 2002b; 2008b). Os resultados da investigação sugerem ser necessária uma razão ω -6/ ω -3 de 1:1 ou 2:1 para proteger contra o desenvolvimento de cancro da mama (Simopoulos, 2001b). Uma razão de 2,5:1 reduz a proliferação de células em doentes com cancro colorectal (Simopoulos, 2002b; 2008b). Uma razão de 2-3:1 suprime a inflamação em pacientes com artrite reumatóide e uma razão 5:1 tem um efeito benéfico em doentes asmáticos enquanto que uma razão 10:1 tem consequências adversas (Simopoulos, 2002b; 2008b).

Atendendo a que as doenças crónicas são multigénicas e multifactoriais é possível que a dose terapêutica de ácidos gordos ω -3 dependa do grau e severidade da doença em resultado da predisposição genética (Simopoulos, 2008 a, b).

2.3 Produção de ácidos gordos poli-insaturados

2.3.1 Fontes não microbianas

O ácido α -linolénico encontra-se nos cloroplastos de alguns vegetais de folha verde tais como o espinafre e a beldroega (*Portulaca olearacea*), em legumes como as lentilhas e em sementes como soja, linhaça, colza e nozes (James et al., 2000; Kris-Etherton et al., 2000; Trautwein, 2001; Simopoulos, 2008b).

O ácido linoleico encontra-se sobretudo nas sementes e óleos de soja, milho, girassol e açafrão (James et al., 2000; Benatti et al., 2004; Christie, 2009b; Scrimgeour, 2005).

As fontes comerciais mais importantes de ácido γ -linolénico são as sementes de Primavera-das-Boticas (*Oenothera biennis*), boragem (*Borago officinalis*) e as sementes de amora negra (*Ribes nigrum*) (Certik & Shimizu, 1999) sendo a última um subproduto da indústria de processamento do fruto e a menos importante em termos económicos (Clough, 2001).

O ácido araquidónico encontra-se sobretudo na carne e vísceras de animais e na gema dos ovos (Freitas et al., 2006).

As principais fontes dos ácidos gordos de cadeia longa EPA e DHA são os peixes gordos como a cavala, o arenque, o salmão e a sardinha (Trautwein, 2001; Yongmanitchai & Ward, 1989) e os óleos de peixe marinho obtidos a partir de espécies que incluem, entre outras, anchovas, capelim (*Mallotus villosus*), bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*), cavala-do-Atlântico (*Scomber scombrus*), arenque-do-Atlântico (*Clupea harengus*) menhaden-do-Atlântico (*Brevoortia tyrannus*), salmonídeos, e sardinhas (Bergé & Barnathan, 2005), tubarão (fígado) e atum (Arts et al., 2001).

A composição em ácidos gordos nos tecidos dos peixes (sobretudo nos triacilgliceróis mas também, em menor extensão, nos fosfolípidos) é determinada pela alimentação e pelo metabolismo (Bell et al., 1997; Bergé & Barnathan, 2005). O peixe possui a capacidade de sintetizar *de novo* os ácidos gordos saturados e mono-insaturados e de absorver selectivamente e metabolizar os ácidos gordos obtidos através da alimentação de forma a atingir a composição característica em ácidos gordos (Bergé & Barnathan, 2005). Esta composição óptima parece ser característica de cada espécie e de cada estirpe tal como a capacidade de conversão de ácidos gordos (Bergé & Barnathan, 2005). Como já foi referido, o peixe de água doce é capaz de alongar e

dessaturar 18:3(ω -3) a EPA e DHA enquanto o peixe marinho, sem Δ -5 dessaturase ou com baixa actividade desta dessaturase, necessita de obter os ácidos gordos de cadeia longa atrás referidos através da alimentação (Sargent et al., 1999a; Sargent et al., 1999b; Craig & Helfrich, 2002). Além da alimentação e do metabolismo, factores ambientais como a temperatura podem influenciar a composição em ácidos gordos. Os peixes de água fria (0-4°C) possuem um teor mais elevado de DHA, possivelmente para regular a viscosidade do sangue (Linko & Hayakawa, 1996). De facto, uma característica das células dos animais poiquilotérmicos é a capacidade de ajustar as características físico-químicas das suas membranas à temperatura exterior, fenómeno conhecido como adaptação homeoviscosa (Fodor et al., 1995; Bergé & Barnathan, 2005).

Exploração comercial de fontes não microbianas

Várias empresas exploram os óleos de peixe como fonte de ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa entre elas a Ocean Nutrition (Halifax, Nova Scotia, Canadá) e a Pronova Biocare (Sadefjord, Norway) que se dedicam ao mercado dos suplementos alimentares e dos alimentos funcionais (Ocean Nutrition Canada, 2009; Pronova Biopharma, 2009).

A produção de alimentos ou de produtos farmacêuticos ricos em PUFAs ω -3 a partir de óleo de peixe apresenta, contudo, alguns problemas: está sujeita a variações sazonais, climatéricas e do local de captura das espécies, das quais podem resultar variações na quantidade e composição do óleo (Molina Grima, 1996; Gill & Valivety, 1997; Kiy et al., 2005); está limitada pela natureza finita dos *stocks* marinhos que torna necessária a imposição de limites de exploração para evitar a depleção dos recursos naturais (Gill & Valivety, 1997); necessita de processos de tratamento para remoção do sabor desagradável e do cheiro característico a peixe (desodorização e refinamento) que impõem elevados custos (Gill & Valivety, 1997); possui um conteúdo elevado de colesterol (Cohen & Cohen, 1991); está sujeita a problemas associados com a poluição ambiental dos ambientes marinhos (acumulação de metais pesados, incluindo mercúrio; dioxinas; PCBs e outros) (Molina Grima, 1996; Ratledge, 2004; Kiy et al., 2005) que afectam não só as comunidades selvagens mas também as explorações em cativeiro. O salmão de cativeiro, sobretudo o produzido na Europa, apresenta níveis elevados de PCBs, dioxinas e outros compostos organoclorados e o seu consumo pode trazer riscos para a saúde (Hites et al., 2004).

Outra desvantagem, associada à obtenção de PUFAs ω -3 a partir de óleo de peixe, reside no facto deste óleo conter teores típicos de EPA e DHA de 14-19% e 5-8%, respectivamente (Bergé & Barnathan, 2005) já que a ingestão de EPA pode reduzir a incorporação de ácido araquidónico (AA) por inibição competitiva (Craig-Schmidt & Huang, 1998). Além disso, níveis elevados de EPA nos suplementos alimentares resultam numa diminuição da capacidade para sintetizar AA a partir do ácido linoleico, obtido através da alimentação (Kyle, 2004). Por outro lado, a administração de óleos contendo EPA em pacientes idosos, hipertensos ou mulheres grávidas, com tempos de protrombina elevados é desaconselhada devido aos efeitos anticoagulantes do EPA (Kyle, 2004).

Em recém-nascidos, a diminuição dos níveis de AA está relacionada com um aumento de peso abaixo do normal (Carlson et al., 1992; 1993) e, nos substitutos do leite materno a presença de EPA está contra-indicada (Bowles et al., 1999) por interferir metabolicamente com a absorção de DHA e com a incorporação deste último nos lípidos do cérebro e da retina (Craig-Schmidt & Huang, 1998; Ratledge, 2005).

Acresce que a transferência de PUFAs ω -3 através da cadeia alimentar aquática tem implicações na tentativa de aumento dos *stocks* de peixe recorrendo à aquacultura porque, em última análise, a aquacultura necessita dos PUFAs ω -3 (Sargent et al., 1999a; Sargent et al., 1999b; Napier & Sayanova, 2005) para o desenvolvimento normal das larvas, para o crescimento do peixe e para a sua reprodução (Miles & Chapman, 2006). Tipicamente as espécies marinhas de cativeiro necessitam de 0,5-2,0% (m/m) de ácidos gordos poli-insaturados ω -3 de cadeia longa na sua alimentação e as espécies de água doce necessitam de 0,5-1,5 % de PUFAs ω -3 com 18 átomos de carbono (Craig & Helfrich, 2002). Assim, a aquacultura, actualmente o maior consumidor de óleo de peixe (cerca de 75% da produção mundial (Oliveira et al., 2006)), é incapaz de operar de forma sustentável (Napier & Sayanova, 2005).

Pelas razões anteriormente referidas e também porque há consenso no que concerne ao facto do óleo de peixe vir a ser insuficiente para satisfazer a procura crescente de PUFAs ω -3 (Sargent, 2001; Bergé & Barnathan, 2005) a produção de PUFAs purificados a partir de óleo de peixe tornou-se inadequada, quer em qualidade, quer em quantidade, para fornecer um mercado em franca expansão, tendo-se assistido nos últimos tempos a um esforço no sentido de desenvolver processos alternativos de produção de EPA e DHA. Estes processos vão desde o desenvolvimento de novas técnicas de refinação de óleos de peixe (Yamamura & Shimomura, 1997) até à

exploração alternativa de fontes microbianas de PUFAs (Barclay et al., 1994; Ratledge, 1993; Lewis et al., 1999).

2.3.2 Fontes microbianas

Apesar de constituir a principal fonte de ácidos gordos ω -3, o peixe marinho possui vias biossintéticas de PUFAs ω -3 com eficiências muito baixas, comparáveis às dos mamíferos; a síntese endógena é limitada e a maioria dos seus ácidos gordos poli-insaturados são obtidos através da alimentação (Yongmanitchai & Ward, 1989; Ward, 1995; Tocher & Ghioni, 1999; Napier & Sayanova, 2005). Contudo, o ambiente aquático é rico em microrganismos capazes de sintetizar de forma eficiente os PUFA ω -3 EPA e DHA (Henderson, 1999; Napier, 2002). É sobretudo através do consumo destes microrganismos ricos em PUFAs ω -3, que o peixe acumula (directamente, ou através do consumo de outros peixes) EPA e DHA (Napier & Sayanova, 2005; Barclay et al., 2005; Napier, 2007).

Entre os microrganismos capazes de produzir PUFAs com mais de 20 átomos de carbono encontram-se os fungos inferiores, bactérias e microalgas marinhas (Bajpai et al., 1991b; Kendrick & Ratledge, 1992; Ratledge, 1993; Certik & Shimizu, 1999; Ratledge et al., 2001a; Pulz & Gross, 2004; Ratledge, 2004; Bergé & Barnathan, 2005).

Apesar de todos os organismos vivos sintetizarem quantidades mínimas de lípidos, os quais desempenham funções estruturais entre outras, só um número reduzido de organismos é capaz de acumular quantidades de lípidos superiores a 20% da sua massa celular como material de reserva (Ratledge, 2004), sobretudo na forma de triacilgliceróis (Ratledge, 2005; Barclay et al., 2005). Como as bactérias geralmente não produzem triacilgliceróis (Ratledge, 1993; Barclay et al., 1994; Russel & Nichols, 1999; Ratledge, 2004) e contêm EPA e DHA sobretudo nos fosfolípidos (Bergé & Barnathan, 2005), a acumulação de lípidos está limitada a algumas leveduras, fungos e um pequeno número de algas referidos como espécies oleaginosas (Ratledge, 2004).

A acumulação de lípidos por microrganismos é um processo dinâmico, que depende do microrganismo, das condições de cultura (pH, temperatura, nutrientes e arejamento) e da fase de crescimento. Assim, a selecção apropriada do microrganismo, a optimização das condições de cultura e a altura em que é efectuada a colheita da

biomassa são factores determinantes para a obtenção de óleos de origem microbiana de forma eficiente (de Swaaf, 2003).

Sabe-se que, regra geral, os microrganismos oleaginosos apresentam duas fases de crescimento distintas. Na primeira fase há uma rápida proliferação celular que continua até que um dos nutrientes essenciais se torne limitante do crescimento (Leman, 1997; de Swaaf et al., 2003c). Neste ponto de carência nutricional, a proliferação de células cessa já que o microrganismo é incapaz de sintetizar componentes necessários à formação de novas células (proteínas, ácidos nucleicos, etc.) mas, se houver carbono disponível, tem início o segundo ciclo de crescimento durante o qual predomina o metabolismo anabólico de lípidos com acumulação de lípidos de reserva, triacilgliceróis na forma de gotas de óleo (Ratledge, 1997; Wynn & Ratledge, 2006) (fig.11).

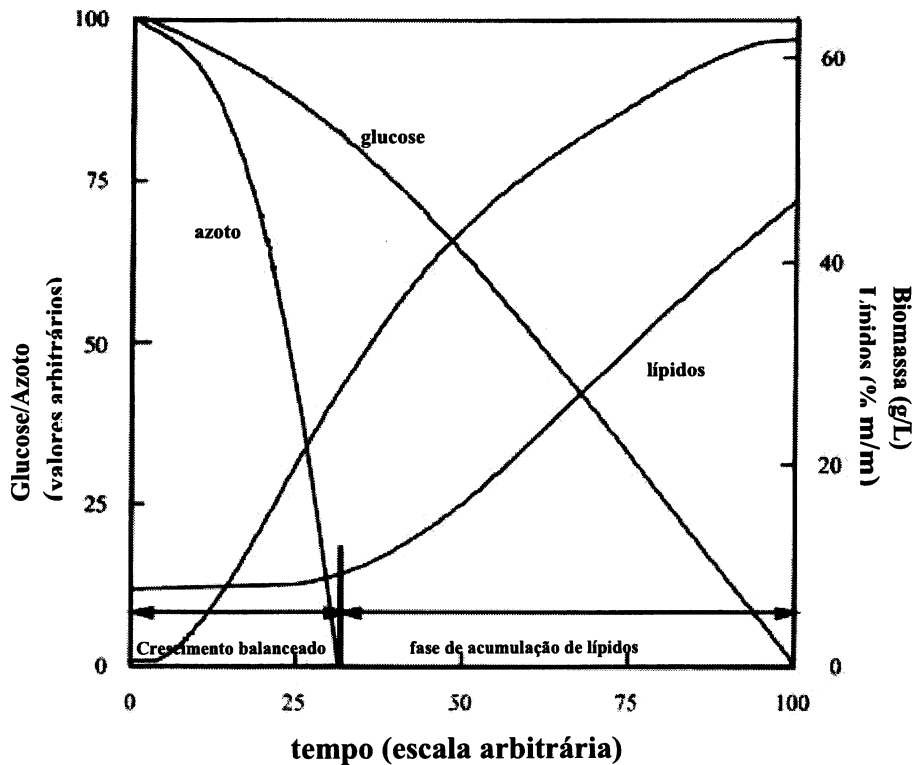


Figura 11 – Representação idealizada do processo de acumulação de lípidos num microrganismo oleaginoso (Ratledge, 2005).

Em algumas espécies oleaginosas a acumulação de óleo pode atingir 70% da biomassa da célula (Ratledge, 1993; Ratledge, 2002; Ratledge, 2004).

No entanto, em cultivos em grande escala, que envolvem vários fermentadores de volume crescente até 150-220 m³, as células são cultivadas de forma a atingir a

concentração máxima de biomassa em cada etapa e, só após a inoculação do fermentador final, é imposta a limitação de azoto e tem início a acumulação de lípidos (Ganuza & Izquierdo, 2007; Ganuza et al., 2008).

Atendendo à sua percentagem de PUFA, os microrganismos oleaginosos marinhos tais como microalgas e fungos (tabela 7) podem constituir alternativas reais aos óleos de peixe.

Tabela 7 – Percentagens de ácidos gordos nos lípidos de alguns microrganismos.

| Organismo | Crescimento | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | ω -6 18:2 | ω -6 18:3 | ω -3 18:4 | ω -6 20:4 | ω -3 20:5 | ω -6 22:5 | ω -3 22:6 | Outros |
|---|-------------|------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| <i>Mortierella alpina</i> CBS 754.68 ^a | H | | 14 | | 7 | 10 | 6 | 5 | | 52 | | | | 6 ω -6 20:3 |
| <i>Mortierella elongata</i> ^a | H | | 17 | | 8 | 33 | 7 | 7 | | 23 | | | | 4 ω -6 20:3 |
| <i>Schizochytrium limacinum</i> SR21 ^b | H | 3 | 49 | | 1 | | | | | | 1 | 6 | 33 | |
| <i>Thraustochytrium aureum</i> ^c | H | 3 | 8 | | | 16 | 2 | 2 | | 3 | | | 52 | |
| <i>Isochrysis galbana</i> ^d | F | 12 | 10 | 11 | 1 | 3 | 2 | | 11 | | 25 | | 11 | |
| <i>Skeletonema costatum</i> ^a | F | 17 | 17 | 11 | | 2 | 1 | | 6 | | 41 | | 7 | |
| <i>Amphidinium</i> sp. ^a | F | 5 | 27 | | 18 | 17 | 2 | 2 | | | 8 | | 17 | 4 20:0 |
| <i>Cryptocodinium cohnii</i> ^e | H | 19 | 20 | 1 | 1 | 14 | | | | | | | 30 | 2 10:0 8 12:0 |
| <i>Ulkenia</i> SAM2179 ^f | H | 2 | 37 | | 1 | | | | | | 1 | 11 | 46 | 1 15:0 |

H – heterotrófico; F – fotoautotrófico.

^a de Swaaf (2003); ^b Yokochi et al., 1998; ^c Sing & Ward (1996); ^d Molina Grima et al. (1993);

^e Harrington & Holz (1968); ^f Tanaka et al. (2007).

Para que a produção de um óleo de origem microbiana seja economicamente viável é necessário que esse óleo não seja facilmente produzido usando técnicas agrícolas convencionais e que seja vendido a um preço elevado, que cubra os custos da sua produção. Actualmente estes requisitos são preenchidos pela produção de PUFA de cadeia longa, inexistentes nos óleos de plantas e que, até à utilização dos óleos de

origem microbiana, apenas podiam ser obtidos a partir de animais marinhos (Ratledge, 2004).

O desenvolvimento de processos de produção de PUFAs de origem microbiana requer a selecção e manutenção do microrganismo apropriado (Lewis et al., 1999), a optimização das técnicas de cultivo (Radwan, 1991), o *scale-up* (Martek, 2009), o controlo dos processos de produção (Sijtsma & de Swaaf, 2004) e o desenvolvimento de tecnologias de extracção, refinação e estabilização dos óleos de forma a satisfazer as necessidades do mercado de forma economicamente rentável (Lewis et al., 1999).

Exploração de fontes microbianas

O primeiro óleo de origem microbiana, um óleo rico em GLA, obtido a partir de *Mucor circinelloides* (antes *Mucor javanicus*) foi produzido entre 1985 e 1990 por J. & E. Sturge Ltd, Selby, North Yorkshire no Reino Unido, utilizando fermentadores de 220 m³ e vendido com a designação de óleo de *Javanicus* e GLA-Forte (Ratledge, 2005). Em menos de 96 h produzia-se biomassa com um teor de GLA de 4% (> 98% na forma de triacilgliceróis) (Ratledge, 1993). A produção (aproximadamente 2 ton por *batch*) terminou em 1990, quando a companhia foi vendida à Rhone-Poulenc Ltd. O fim da produção coincidiu com a queda de preços do óleo da Primavera-das-Boticas e com o advento da boragem como fonte alternativa, mais barata, de GLA (Ratledge, 2005).

Processos similares de produção de GLA-SCO foram desenvolvidos no Japão pela Idemitsu Kosan Co. Ltd, Tokyo utilizando *Mortierella isabellina* e, possivelmente, *Mortierella ramanniana* (Ratledge, 1993; Ratledge, 2005). As vendas do óleo, utilizado como aditivo alimentar, tiveram início em 1988 e não se sabe ao certo quando e se terminaram (Kyle, 2005).

Para a produção de ácido araquidónico (AA) são utilizadas actualmente várias estirpes de *Mortierella*, em processos diferentes (tabela 8), na Europa, China e, possivelmente, no Japão (Ratledge, 2004).

Tabela 8 – Perfil de ácidos gordos (% relativas m/m), dos SCO ricos em AA actualmente em produção (Ratledge, 2004).

| | 14:0 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3(n-6) | 20:3(n-6) | 20:4(n-6) | 22:0 | 24:0 |
|-----------------------|------|------|------|------|------|-----------|-----------|-----------|------|------|
| Processo DMS | 0,4 | 8 | 11 | 14 | 7 | 4 | 4 | 49 | - | 1 |
| Processo Wuhan Alking | 0,2 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | - | 70 | 3 | 5 |

O processo DSM decorre em Itália e utiliza uma estirpe seleccionada do fungo *Mortierella alpina*. Em fermentadores de cerca de 100 m³ de capacidade é produzido um óleo com aproximadamente 40% de AA (ARASCO) (Ratledge, 2004). O óleo é vendido exclusivamente à Martek Biosciences Corp. e é misturado numa razão de 2:1 (v/v) com DHASCO™ (DHA de origem microbiana, obtido por fermentação de *Cryptocodinium cohnii*) para incorporação em formulações infantis sob o nome Formulaid. A produção em 2003 foi de 480 ton (Ratledge, 2004).

O processo Wuhan Alking decorre em Wuhan, na China, e utiliza fermentadores de 50-100 m³ de capacidade e uma nova estirpe de *Mortierella alpina*. Foi anunciado em Setembro de 2004 que a companhia americana Cargill iria comercializar este ácido provavelmente fora dos EUA e da Europa (Ratledge, 2004).

Investigadores japoneses tentaram modificar o processo de produção de AA por *Mortierella*, de forma a obter EPA. As modificações consistiam em crescer o fungo a baixas temperaturas ou no arrefecimento da biomassa colhida, durante alguns dias, de forma a induzir a produção de EPA (Barclay et al., 2005). Contudo, ainda não há registo da produção comercial deste ácido.

Pensa-se que a Nagase-Suntory Co. Ltd, no Japão, produz DPA, um ácido gordo presente nos óleos ricos em DHA produzidos por *Schizochytrium* spp., mas não se sabe se o ácido gordo é produzido por fraccionamento do óleo de *Schizochytrium* ou por um microrganismo específico (Ratledge, 2005) como o descrito por Kumon e colaboradores (2003) como produtor de DPA como único ácido gordo poli-insaturado de cadeia longa.

Os processos de produção de DHA serão abordados em 2.5.2.

Em apenas vinte anos, os óleos de origem microbiana passaram de simples curiosidades académicas a principal fonte de PUFAs para nutrição infantil (Ratledge, 2004).

Uma vez que as plantas são incapazes de sintetizar ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa (ω -3 e ω -6) a única alternativa aos óleos de origem microbiana serão as plantas modificadas geneticamente, isto é, a utilização das plantas como “fábricas químicas” de PUFAS que acumulem estes ácidos gordos nos lípidos de reserva das suas sementes (López Alonso & Garcia Maroto, 2000; Thelen & Ohlogge, 2002). Contudo, esta via apresenta ainda muitas dificuldades técnicas (é preciso colocar os genes correctos nas plantas apropriadas e fazer com que se expressem na altura certa, isto é, apenas nas sementes e na fase de acumulação de óleo) (Ratledge, 2005). Além disso, há que contar com a resistência dos consumidores à utilização de Organismos

Geneticamente Manipulados (OGMs) sobretudo na alimentação, quando alguns óleos se destinam à alimentação infantil (Kyle, 2005). Na Comunidade Europeia, por exemplo, não é permitida a utilização de OGMs em formulações infantis (Kyle, 2005).

Embora a contribuição dos óleos microbianos para a indústria seja ainda pequena, existem várias razões para que a mesma venha a aumentar num futuro próximo como consequência das seguintes vantagens:

- alguns PUFAs de origem microbiana podem ser vendidos a um preço elevado;
- as fontes microbianas podem produzir óleos com um elevado conteúdo em PUFAs;
- a estabilidade oxidativa dos lípidos microbianos é, em geral, superior à dos óleos de peixe;
- a produção microbiana faz-se a partir de matérias-primas sustentáveis;
- o conhecimento das vias bioquímicas e da genética pode fornecer as ferramentas para novos sistemas de produção e para novos produtos (Sijtsma & Swaaf, 2004).

Ao contrário do óleo de peixe que apresenta um perfil complexo de ácidos gordos (totais e poli-insaturados) os óleos de origem microbiana possuem um perfil de ácidos gordos relativamente simples e apresentam quantidades apreciáveis de um PUFA específico (Wynn et al., 2005) (Tabela 9), facto que facilita a tarefa de purificação desse PUFA (Ratledge, 1993) e, assim sendo, constitui uma vantagem dos óleos de origem microbiana.

Além disso, o cultivo em fermentador ou fotobioreactor, em condições controladas, permitiu eliminar contaminações (Wen & Chen, 2005) e a economia de escala permitiu reduzir o preço dos óleos de origem microbiana obtidos em fermentador entre 10 e 30 vezes (Arts et al., 2001).

Em suma, embora a oportunidade de exploração dos óleos de origem microbiana possa ser finita, os mesmos deverão constituir a principal fonte de PUFAs para aplicações farmacêuticas e nutricionais nas próximas décadas (Ratledge, 2003; Ratledge, 2005).

Tabela 9 – Perfil de ácidos gordos (% relativas m/m) de alguns óleos microbianos, vegetais e animais.

| Ácido gordo | <i>Cryptocodinium cohnii</i> (a) | <i>Schizochytrium</i> (a) | <i>Ulkenia</i> sp. (b) | Óleo de peixe (óleo de fígado de bacalhau) (c) | Óleo vegetal (óleo de colza) (d) | Óleo animal (banha) (c) |
|-------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------------------|---|--|----------------------------|
| 10:0 | 0-0,2 | - | - | - | - | - |
| 12:0 | 3-5 | 0-0,5 | - | - | - | - |
| 14:0 | 14-16 | 9-15 | 2,7 | 5 | - | 1 |
| 15:0 | | | 1,2 | - | - | - |
| 16:0 | 10-14 | 24-28 | 29,7 | 13 | 3 | 25 |
| 16:1 | 2-3 | 0,2-0,5 | - | 6 | - | 3 |
| 18:0 | 0-0,3 | 0,5-0,7 | 1,1 | 2 | 1 | 13 |
| 18:1 | 9-10 | - | - | 27 | 64 | 43 |
| 18:2 | - | - | - | 10 | 22 | 11 |
| 18:3n-6 | - | - | - | - | - | - |
| 18:3n-3 | - | - | - | 3 | 8 | <1 |
| 18:4n-3 | - | - | - | - | - | - |
| 18:5n-3 | - | - | - | - | - | - |
| 20:1 | - | - | - | - | 1 | - |
| 20:3n-6 | - | 0-0,5 | - | 1 | - | - |
| 20:4n-3 | - | 0,5-1 | - | - | - | - |
| 20:4n-7 | - | - | 1,0 | - | - | - |
| 20:4n-6 | - | - | - | - | - | - |
| 20:5n-3 | - | - | 1,6 | 10 | - | - |
| 22:5n-6 | - | 11-14 | 10,5 | 1 | - | - |
| 22:6n-3 | 50-60 | 35-40 | 46,0 | 5 | - | - |

(a) Ratledge et al., 2005; (b) Kiy et al., 2005; (c) Mcguire et al., 1997;

(d) Wynn et al., 2005.

2.4 Produção de ácidos gordos poli-insaturados por microalgas marinhas

2.4.1 *via* autotrófica

As microalgas são maioritariamente fotoautotróficas (Barclay, 1992), isto é, utilizam a luz como fonte de energia e dióxido de carbono como fonte de carbono (Chen, 1996). Embora o crescimento de organismos fotossintéticos seja atractivo, atendendo a que as fontes de carbono e energia são gratuitas, esta vantagem é ilusória

(Wynn et al., 2005) e apesar de terem sido feitas várias tentativas de produzir PUFA's autotroficamente, os processos revelaram-se demasiado dispendiosos para produção industrial devido às baixas densidades celulares obtidas (Ward & Singh, 2005).

Nos sistemas mais antigos e mais simples de cultivo de algas – lagoas abertas – o *scale-up* é difícil devido a problemas de contaminação com outras algas, bactérias e protozoários (Wen & Chen, 2005); as condições de cultura são difíceis de manter e a recolha de biomassa a partir da cultura diluída é dispendiosa (Chen, 1996; Wen & Chen, 2005). Por exemplo, Cohen & Himer (1992) referiram uma produtividade de 0,5 mgL⁻¹dia⁻¹ em EPA por *P. cruentum*, no Inverno, e de 1,0 mgL⁻¹dia⁻¹, no Verão.

A utilização de fotobioreactores fechados com iluminação natural e/ ou artificial permite ultrapassar alguns dos problemas das lagoas abertas (Chen, 1996; Molina Grima et al., 1999a). No entanto, estes sistemas têm configurações e construção complexas, têm elevados custos de capital e o seu *scale-up* é difícil (Wen & Chen, 2005). Além disso, não permitem contornar de forma totalmente satisfatória o problema da limitação de luz já que a penetração da luz nas culturas é inversamente proporcional à concentração celular (Chen & Johns, 1995). Qiang et al. (1997) obtiveram uma produtividade de 60 mgL⁻¹dia⁻¹ em EPA com culturas de *Monodus subterraneus* crescidas em bioreactor.

Apesar da operação dos fotobioreactores ser proibitivamente dispendiosa, as algas fotossintéticas continuam a ser consideradas como candidatas potenciais para a produção industrial de óleos microbianos sobretudo para aquacultura já que constituem a melhor fonte de nutrientes (e também a mais natural) para larvas e peixe nos primeiros estádios de desenvolvimento (Ward & Singh, 2005).

2.4.1 via heterotrófica

Algumas microalgas são heterotróficas o que significa que podem crescer e reproduzir-se na ausência de luz, utilizando substratos orgânicos como fonte de carbono e energia (Barclay, 1992; Lee, 2001; Wen & Chen, 2003; Chen & Chen, 2006).

Embora a maioria dos processos estudados até à data se baseiem no crescimento autotrófico de microalgas (Olaizola, 2003), o crescimento heterotrófico das mesmas descrito para a produção de alguns SCO (Barclay, 1992; Borowitzka, 1995; Kyle, 1996;

Chen, 1996) apresenta vantagens em relação ao crescimento autotrófico. Nas culturas heterotróficas:

- as condições ótimas de crescimento e produção podem ser mantidas (Chen, 1996);
- a contaminação e a predação podem ser eliminadas, esterilizando o meio e trabalhando em condições assépticas (Chen, 1996);
- a produção do óleo é independente da estação do ano e das condições climáticas (Sijtsma & de Swaaf, 2004) pelo que a reprodutibilidade do processo aumenta e o *scale-up* torna-se mais fácil;
- podem atingir-se elevadas densidades celulares (Barclay et al., 1994; de Swaaf et al., 2003c) que compensem os custos elevados do meio de cultura e da esterilização (Chen, 1996);
- o processo de produção pode ser controlado respeitando as regras de *Good Manufacture Practice* (GMP), garantindo a qualidade do produto obtido (Sijtsma & de Swaaf, 2004);
- a tecnologia necessária à cultura heterotrófica já está consolidada (Apt & Behrens, 1999; Sijtsma & de Swaaf, 2004);
- a capacidade de produção pode ser adaptada em função das necessidades dos mercado (Wynn et al., 2005).

Ao permitir aumentar a concentração em biomassa e, portanto, a produtividade volumétrica, a cultura heterotrófica pode ser aplicada à produção de produtos de elevado valor acrescentado e baixo volume já que as elevadas concentrações atingidas permitem diminuir os custos de processamento posterior, os quais podem constituir uma grande percentagem dos custos de produção (Chen, 1996).

Contudo, a cultura heterotrófica de microalgas não está isenta de problemas. Estes incluem o número limitado de espécies capazes de crescer heterotroficamente (Barclay, 1992; Chen, 1996), a contaminação por bactérias já que a cultura das microalgas necessita de meios de crescimento ricos e apresenta taxas de crescimento relativamente baixas (Sijtsma & de Swaaf, 2004), a inibição do crescimento por substratos orgânicos solúveis em baixas concentrações e a incapacidade de produzir compostos dependentes da luz tais como pigmentos (Chen, 1996; Cerón Garcia et al., 2005).

A microalga *Nitzschia laevis* mostrou-se promissora para a produção de EPA e, em condições heterotróficas apresenta uma taxa específica de crescimento e uma concentração de EPA mais elevadas ($0,344 \text{ d}^{-1}$ e $35,08 \text{ mgL}^{-1}$, respectivamente)

comparativamente aos apresentados em condições fotoautotróficas (0,167 d⁻¹ e 6,78 mgL⁻¹, respectivamente) (Wen & Chen, 2000a) tendo sido desenvolvido um processo *fed-batch* que permitiu obter 695 mgL⁻¹ de EPA, superior ao obtido em *batch* (301,2 mgL⁻¹ de EPA) (Wen et al., 2002) e uma cultura de perfusão onde se obtiveram 11112 mgL⁻¹ de EPA com uma alimentação de glucose de 50 gL⁻¹ (Wen & Chen, 2002). O desenvolvimento de técnicas de cultivo de elevada densidade celular permite ainda diminuir os custos de recuperação e purificação do EPA (Wen & Chen, 2005).

No entanto, a produção de EPA a partir de microalgas ainda não é uma realidade em termos comerciais uma vez que é mais dispendiosa que a obtenção de EPA com elevado grau de pureza a partir do óleo de peixe (Molina Grima et al., 2003). As baixas produtividades em EPA são atribuídas ao baixo teor de EPA nas células e a taxas específicas de crescimento relativamente baixas (Wen & Chen, 2005). Por outro lado, as algas produtoras de EPA apresentam um perfil de ácidos gordos relativamente complexo comparativamente ao das algas produtoras de DHA (de Swaaf et al., 2003c). Baixas produtividades associadas perfis de ácidos gordos relativamente complexos implicam elevados custos de operação e purificação do EPA e limitam a aplicação das microalgas para produção de EPA (Wen & Chen, 2005).

A produção comercial de DHA será abordada no ponto 2.5.2.

2.5 DHA

2.5.1 Funções e aplicações

O ácido docosahexaenóico (fig. 12) é um ácido gordo poli-insaturado com 22 átomos de carbono e seis ligações duplas nas posições 4, 7, 10, 14, 16 e 19 (átomos de carbono numerados a partir do terminal carboxilo). O seu nome sistemático é ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico, ou na notação abreviada, 22:6n-3 (DHA). O nome comum (trivial) é ácido cervónico.

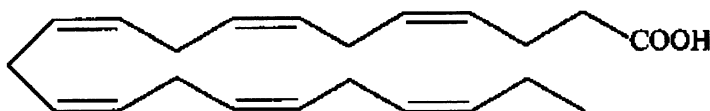


Figura 12 – Representação do ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω -3).

O grau de insaturação de um ácido gordo determina a sua estrutura tridimensional (Haag, 2003). A introdução progressiva de ligações duplas numa cadeia de átomos de carbono faz com que a mesma encurve e, quanto mais dobrado estiver um ácido gordo, mais espaço ele vai ocupar se fizer parte dos fosfolípidos das membranas celulares, aumentando a fluidez e, provavelmente, a funcionalidade da membrana (Haag, 2003).

A estrutura e o ponto de fusão (-44°C) (Sato et al., 2009) estão na base das propriedades físico-químicas características do DHA. O DHA pode alterar significativamente muitas propriedades básicas das membranas celulares incluindo a fluidez, compressibilidade, permeabilidade e interacção com proteínas reguladoras (Holub, 2006).

O DHA é o ácido gordo mais insaturado presente nas membranas dos sistemas biológicos dos mamíferos (Weil, 2000a). Encontra-se em níveis muito elevados na posição *sn-2* dos fosfolípidos de membrana no cérebro e na retina, bem como nas células do tecido cardíaco e no esperma (Arts et al., 2001). Também está presente nos lípidos do leite materno em concentrações que variam de 0,1 a 1,0 g/100g de leite, consoante a dieta das mães (Innis, 2004; 2007) e que são pelo menos trinta vezes superiores às presentes no leite de vaca (Bajpai et al., 1991b; Singh et al., 1996; Singh, 2008).

O DHA desempenha um papel fundamental no cérebro onde a sua presença está relacionada com o funcionamento dos receptores da membrana, regulação de neurotransmissores dopaminérgicos e serotinérgicos, regulação de enzimas ligadas à membrana (ATPases Na/K dependentes), transdução de sinais e alteração do fluxo iónico através dos canais de Na^+ e K^+ (Sinclair et al., 2005).

O DHA também está envolvido em processos metabólicos como a regulação da síntese de eicosanóides derivados do ácido araquidónico, como precursor de docosatrienos e resolvinas 17 S (intermediários anti-inflamatórios) derivados do DHA e na regulação da expressão genética (Sinclair et al., 2005).

Finalmente, o DHA está envolvido na protecção das células neurais de apoptose, no desenvolvimento dos neurónios e na regulação do tamanho dos mesmos (Sinclair et al., 2005) e funciona como precursor de neuroprostanos (produtos de oxidação do DHA) (Roberts et al., 1998; Fam et al., 2002). Em última análise, o efeito do DHA na actividade neural afecta o conhecimento e o comportamento (Hadley et al., 2009).

Um aporte adequado de DHA é importante durante toda a vida mas sobretudo durante a gravidez e lactação (Koletzko et al., 2008). O DHA acumula-se nas células do cérebro e da retina no último trimestre da gravidez e ao longo dos primeiros dois anos de vida (Martinez, 1992; Clandini et al., 1980; Helland et al., 2003; McCann & Ames, 2005) sobretudo durante a expansão e maturação perinatal (McNamara & Carlson, 2006). Estudos com isótopos estáveis de ALA demonstraram que os bebés, prematuros ou não, são capazes de sintetizar DHA a partir de ALA (Salem et al., 1996; Uauy et al., 2000) embora em quantidades insuficientes para assegurar o seu desenvolvimento normal (Horrocks & Yeo, 1999; Simopoulos et al., 1991; Koletzko et al., 2001a, 2008). Assim, o feto e o recém-nascido dependem da mãe para lhe fornecer DHA, através da placenta ou do leite (Uauy & Peirano, 1999; Crawford, 2000; Innis, 2003).

Apesar de não estarem definidos os teores óptimos de DHA no sangue e nos diferentes tecidos, sabe-se que os bebés saudáveis não amamentados, necessitam de obter da alimentação quantidades de DHA próximas das encontradas, em média, no leite humano para atingirem teores de DHA no sangue semelhantes aos dos bebés amamentados (Hoffman et al., 2006). Assim, a conversão inadequada de ALA a DHA e a substituição do DHA nos fosfolípidos de membrana, poderá explicar os défices nos desenvolvimentos visual e cognitivo observados nos bebés alimentados com formulações com quantidades mais baixas de DHA e AA (Hoffman et al., 2006).

Reconhecendo a importância do DHA e do AA nos substitutos de leite materno, a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO*), a Fundação Britânica de Nutrição (*British Nutrition Foundation – BNF*), a Sociedade Europeia de Pediatria, Gastroenterologia e Nutrição (*European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition – ESPGAN*) e a Sociedade Internacional para o estudo de Ácidos Gordos e Lípidos (*International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids – ISSFAL*) recomendam a inclusão destes ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa em todas as formulações para bebé (Boswell et al., 1996). Dois anos após a sua entrada no mercado em Fevereiro de 2002, mais de 50% das formulações vendidas nos Estados Unidos continham uma mistura de DHA e AA (Wynn et al., 2005). Actualmente as formulações enriquecidas em DHA e AA representam 99% do mercado das formulações para bebé nos Estados Unidos da América e estão disponíveis em mais de 75 países (Martek Biosciences Corporation, 2008) sendo de prever um aumento da sua procura até que, eventualmente todas as formulações contenham DHA.

2.5.2 Processos de produção microbianos

Embora muitas microalgas possuam a capacidade de sintetizar PUFAs ω -3 poucas se têm revelado satisfatórias para a sua produção comercial, sobretudo se nos reportarmos a espécies heterotróficas capazes de crescer em fermentadores convencionais.

As algas marinhas utilizadas na produção de PUFAs ω -3 incluem os géneros *Traustochytrium*, *Schizochytrium* e *Ulkenia* por vezes classificados como fungos marinhos (Henderson, 1999; Bongiorno et al., 2005) e o dinoflagelado *Cryptocodinium cohnii*.

Actualmente existem pelo menos três processos industriais de produção de DHA por via fermentativa (tabela 10), cada um utilizando um microrganismo diferente (Ratledge, 2004; 2005).

Tabela 10 – Perfil de ácidos gordos dos SCO ricos em DHA actualmente em produção (% relativas m/m) (Ratledge, 2005).

| Ácido gordo | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3(n-3) | 20:3(n-6) | 22:5 (n-6) | 22:6(n-3) |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|-----------|------------|-----------|
| Processo Martek DHASCO™ | 4 | 20 | 18 | 2 | 0,4 | 15 | 0,6 | - | - | - | 39 |
| Processo Omega- Tech DHASCO-S | | 13 | 29 | 12 | 1 | 1 | 2 | 3 | 2 | 12 | 25 |
| Processo Nutrinova DHActive | | 3 | 30 | - | - | - | - | - | - | 11 | 46 |

O processo Martek utiliza *C. cohnii* e será discutido mais adiante (2.7).

O processo Omega-Tech utiliza *Schizochytrium* sp. O óleo, inicialmente conhecido como DHAGold™ é produzido pela OmegaTech LTD., Boulder, CO, adquirida pela Martek (Ratledge, 2004) e, actualmente designado DHA-S.

A produção de DHA-S é efectuada a partir de uma estirpe melhorada de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 num processo em *fed-batch*. Culturas puras congeladas são utilizadas para inocular frascos agitados, os quais por sua vez, produzem o inóculo para um tanque de sementeira que servirá para inocular o fermentador. O meio de cultura é constituído por uma fonte de carbono, uma fonte de azoto, minerais traço e vitaminas. A temperatura, pH e arejamento são controlados para assegurar a reprodutibilidade do processo e a composição do produto final (OmegaTech, 2001).

A biomassa é separada do caldo de fermentação utilizando um secador de tambor duplo; a biomassa seca é suspensa em *n*-hexano comercial e moída, em húmido, para extrair o óleo. Por filtração, separa-se a fracção rica em óleo, que é arrefecida durante um determinado tempo de forma a cristalizar os componentes com maior ponto de fusão mais elevado (winterização). Por filtração, separa-se a fracção cristalizada e, finalmente, remove-se o hexano do óleo winterizado (OmegaTech, 2001).

O óleo winterizado é processado de forma semelhante aos óleos vegetais. É refinado, branqueado e desodorizado. Por último, são-lhe adicionados anti-oxidantes de acordo com a directiva 95/2/EC e é embalado sob atmosfera de azoto para prevenir a oxidação (OmegaTech, 2001).

Em 2004 a utilização dos óleos de *Schizochytrium* em alimentos foi considerada segura (*Generally Recognised as Safe* – GRAS) nos EUA (Food and Drug Administration, 2004) tendo também sido concedidas aprovações para a sua utilização em alimentos na Austrália e Nova Zelândia em 2002 e na Europa em 2003 (Official Journal of the European Union, 2003; Barclay et al., 2005)

O processo Nutrinova utiliza *Ulkenia* sp.. O óleo é produzido pela Nutrinova GmbH, Frankfurt, Germany e vendido sob a designação DHActive.

Ulkenia sp. cresce em meios de cultura constituídos por glucose e extracto de levedura em fermentadores convencionais de aço inoxidável de 80 m³, a uma temperatura próxima dos 30°C. As células são colhidas quando deixam de se multiplicar e acumular triacilgliceróis (Kiy et al., 2005). A extracção do óleo é efectuada sobre a biomassa seca, utilizando hexano (Food Standards Australia Newzealand, 2004). O processo de refinamento do óleo inclui passos de desengorduramento, neutralização, branqueamento e desodorização (Kiy et al., 2005).

Kroes et al. (2003) descreveram testes toxicológicos efectuados com o óleo obtido por fermentação de *Ulkenia* sp. (contendo 45% m/m de DHA). Os resultados destes testes foram negativos para toxicidade genética e semelhantes aos obtidos utilizando PUFAs ω -3 obtidos a partir de óleo de peixe ou de outras fontes microalgais.

A utilização do óleo rico em DHA obtido a partir de *Ulkenia* sp. foi autorizada na Austrália e Nova Zelândia em 2004 (tendo a solicitação do reconhecimento GRAS sido retirada a pedido dos responsáveis pelo produto (Food and Drug Administration, 2005).

Ao contrário dos óleos obtidos a partir de plantas oleaginosas ou a partir de peixe, os óleos obtidos a partir de *Cryptocodinium cohnii*, *Schizochytrium* sp. e

Ulkenia sp. estão livres de pesticidas, aflotoxinas, insecticidas organofosfatados e organoclorados, metais pesados e outros poluentes, como bifenóis policlorados (PCBs) muitas vezes encontrados no peixe, facto que simplifica o processo final de refinação destinado a eliminar as impurezas co-extraídas com o óleo (Ratledge et al., 2005).

2.5.3 Optimização da produção microbiana de DHA

Para além da selecção da espécie e da estirpe, já que a concentração de biomassa e o teor em ácidos gordos varia entre as espécies de um mesmo género e entre estirpes da mesma espécie (Anbu et al., 2007), a optimização da produção de DHA por processos biotecnológicos exige a identificação das variáveis que afectam a quantidade e a distribuição dos ácidos gordos produzidos pela estirpe seleccionada, sendo que os triacilgliceróis são a principal classe de lípidos a considerar na produção de DHA (Vazhappily, 1999).

O conteúdo em PUFAs de cadeia longa e, mais importante, a sua distribuição nos triacilgliceróis, depende não só da espécie mas também de factores relacionados com as condições ambientais e de cultura: composição do meio de cultura, taxa de arejamento, intensidade de luz e duração do fotoperíodo (para microrganismos fotossintéticos em autotrofia), temperatura e idade da cultura (Yongmanitchai & Ward, 1989; Dunstan et al., 1993; Li & Ward, 1994; Singh & Ward, 1996; Robles Medina et al., 1998; Yokochi et al., 1998; Chen & Chen, 2006). Contudo, o efeito das condições ambientais nos lípidos e ácidos gordos das algas não é ainda completamente conhecido e, factores ambientais semelhantes podem exercer efeitos diversos, inclusivamente opostos, em espécies diferentes (Cohen & Heimer, 1992), isto é, a produção e o armazenamento de lípidos em resposta a factores ambientais também são específicos de cada espécie (Fan et al., 2007).

A produção comercial de DHA exige ainda a implementação de estratégias de obtenção de elevadas densidades celulares.

2.5.3.1 Composição do meio de cultura

Um aspecto importante no projecto de um processo de fermentação é a escolha do meio de fermentação, cuja composição pode afectar significativamente a concentração do produto e, consequentemente, o rendimento e a produtividade volumétrica (Kennedy & Krouse, 1999).

O meio de fermentação deve conter, no mínimo, uma fonte de carbono, de azoto e de energia; conter todos os minerais essenciais ao crescimento; conter os factores de crescimento necessários para assegurar um rápido crescimento e um rendimento elevado no produto desejado; possuir uma qualidade consistente e estar disponível durante todo o ano ao menor custo possível; causar um mínimo de problemas noutros aspectos da fermentação tais como, por exemplo, não dificultar ou facilitar a transferência de massa gás-líquido; causar o mínimo de problemas de processamento *downstream* (Nielsen et al., 2003a).

Actualmente estão disponíveis várias matérias-primas que podem ser utilizadas como substratos para fermentação. Desde as fontes de carbono e azoto tradicionais até sub-produtos e efluentes agrícolas e industriais que até aqui não tinham sido considerados como tal.

As vantagens da utilização dos meios complexos atrás referidos (sub-produtos e efluentes) residem no facto dos mesmos conterem, além da fonte de carbono, uma fonte de azoto orgânica, minerais essenciais e diferentes factores de crescimento. Apresentam contudo, algumas desvantagens: variação sazonal da composição, variação da composição com o armazenamento e presença, eventual, de compostos indesejáveis que podem dificultar a reprodutibilidade do processo (Nielsen et al., 2003a).

2.5.3.1.1 Fontes de carbono (C)

Enquanto as microalgas fotoautotróficas utilizam CO₂ como fonte de carbono e luz como fonte de energia (Kyle, 1989; Wood et al., 1999), as microalgas heterotróficas são capazes de crescer no escuro e necessitam de pelo menos uma fonte de carbono orgânico (Chen, 1996; Wen & Chen, 2003; 2005; Chen & Chen, 2006). Neste caso, as fontes de C fornecem a energia e o esqueleto de átomos de C para o crescimento das células (Wen & Chen, 2003; Chen & Chen, 2006).

Glucose

A glucose é um nutriente importante no crescimento heterotrófico e a fonte de carbono mais utilizada na produção de lípidos por microrganismos (Wen & Chen, 2000 b; Sijtsma et al., 2005).

A glucose constitui uma matéria-prima acessível à maioria dos processos industriais. Normalmente é obtida na forma de xaropes por hidrólise, química ou enzimática, de amido de milho. É solúvel em água, pode ser armazenada na forma de soluções concentradas e pode ser facilmente esterilizada e adicionada ao meio de fermentação (Sijtsma et al., 2005).

A concentração inicial de glucose afecta o crescimento e a produção de DHA por *C. cohnii* (Jiang & Chen, 2000a), por *Thraustochytrium* sp. (Singh et al., 1996), *Thraustochytrium aureum* (Bajpai et al. 1991a) e por *Shizochytrium limacinum* SR21 (Yaguchi et al., 1997; Yokochi et al., 1998).

C. cohnii cresce bem em glucose (estirpe Seligo, Tuttle and Loeblich 1975; estirpe ATCC 40750, Kyle et al. 1998; estirpe UTEX L 1649, Vazhappily and Chen 1998; estirpes ATCC 30556, ATCC 50051, UTEX L 1649 e RJH, Jiang et al. 1999; estirpes ATCC 30556, ATCC 50051 e RJH, Jiang & Chen 1999; estirpe ATCC 30772, de Swaaf et al. 1999; estirpes UTEX L 1649, CCMP 316 e ATCC 50297, Vazhappilly 1999; estirpe ATCC 30556, Jiang & Chen 2000a; estirpe ATCC 30556, Jiang & Chen 2000b; estirpe ATCC 30772, de Swaaf et al. 2003c).

Jiang et al. (1999) testaram três meios de cultura, previamente descritos, no crescimento de *C. cohnii*: Phorphyridium (Starr & Zeikus, 1993), A₂E₆ (Nerad, 1996) e *C. cohnii* (Spector, 1984), todos contendo glucose como principal fonte de carbono. Concluíram que as estirpes ATCC 30556, ATCC 50051, UTEX L 1649 e RJH crescem melhor e apresentavam taxas específicas de crescimento superiores em meio Phorphyridium. Entre elas, a estirpe *C. cohnii* ATCC 30556 mostrou melhor potencial para a produção comercial de DHA.

Jiang & Chen (2000a) estudaram o efeito da concentração de glucose no crescimento e produção de DHA por *C. cohnii* ATCC 30556 e concluíram que, na gama de concentrações estudadas (5-40 gL⁻¹), a maior taxa específica de crescimento (0,12 h⁻¹), a maior concentração em biomassa (3, 13 gL⁻¹) e o maior rendimento em glucose (0,6 gg⁻¹) correspondiam a uma concentração de glucose de 20 gL⁻¹. Contudo, obtiveram a maior percentagem relativa de DHA (53,4% do total de ácidos gordos) para 5 gL⁻¹ de glucose. Para concentrações de glucose superiores a 20 gL⁻¹ os autores

obtiveram taxas específicas de crescimento e concentrações de biomassa inferiores, provavelmente devido à inibição pela glucose. De Swaaf et al. (1999) também referiram a inibição pelo substrato para explicar a inibição do crescimento de *C. cohnii* (ATCC 30772) para concentrações de glucose superiores a 25 gL^{-1} , embora a microalga seja capaz de crescer para concentrações iniciais de glucose tão elevadas como $84,3 \text{ gL}^{-1}$.

À escala laboratorial (1 L), em *batch*, de Swaaf et al. (1999) obtiveram, uma produtividade volumétrica de DHA de $19 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$ por *C. cohnii* ATCC 30772 em glucose. De Swaaf et al. (2003c) obtiveram, para a mesma estirpe, produtividades semelhantes ($14 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$) em *fed-batch*, utilizando uma alimentação de 50% (m/v) de glucose.

Schizochytrium sp. também se desenvolve em glucose (estirpe SR21, Yaguchi et al., 1997; Yokochi et al., 1998; Yokochi et al., 2003; estirpe G13, Bowles et al., 1999; estirpes KF1, KF2, KF4, KF5, KF6, KF7 e KF14, Fan et al., 2001; estirpes N-1, N-2, N-5, N-6 e N-9, Kamlangdee & Fan, 2003; estirpe S31 (ATCC 20888), Wu et al, 2005; estirpe KH105, Yamasaki et al., 2007; estirpe OUC88, Zhu et al., 2008; estirpe G13/2S, Ganuza et al., 2008).

Yokochi et al. (1998) estudaram o crescimento e a produção de DHA por *Schizochytrium limacinum* SR21 para várias concentrações de glucose, de 3 a 12 % (m/v); verificaram que o crescimento celular aumentava com a concentração da fonte de carbono até 9% e era inibido para 12 % de glucose e obtiveram uma concentração máxima de DHA ($4,20 \text{ gL}^{-1}$) para 9% (m/v) de glucose, ao fim de cinco dias.

Chin et al. (2006) estudaram o crescimento da mesma estirpe para concentrações de glucose de 1% a 6% (m/v) e verificaram que a concentração de biomassa aumentava com o aumento da concentração de glucose no meio até 4% ($7,27 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa) e diminuía para concentrações de glucose de 5 e 6%. No entanto, as culturas crescidas com 5% de glucose apresentavam o maior teor em lípidos sem que se registassem alterações significativas do teor de DHA. Assim, a produtividade em DHA aumentava com o aumento da concentração de glucose no meio de 1% para 5% e diminuía para 6% de glucose.

Bowles et al. (1999), num estudo semelhante, para a estirpe *Schizochytrium mangrovei* G13 verificaram que um aumento da concentração de glucose no meio ($0\text{-}30 \text{ gL}^{-1}$) se traduzia num aumento da concentração de biomassa; obtiveram uma produção máxima de lípidos (65-66% m/m) para as condições com 20 e 30 gL^{-1} de glucose. Apesar do teor em DHA nos lípidos ser superior nas culturas crescidas com 5 gL^{-1} de

glucose, a concentração máxima de DHA ($0,575 \text{ gL}^{-1}$) foi obtida para uma concentração da fonte de carbono de 30 gL^{-1} , ao fim de 4 dias.

Num estudo semelhante, para a estirpe *Schizochytrium* sp. KH105, Yamasaki et al. (2007) também concluíram que, na gama estudada (3-15% m/v), a concentração em biomassa e em DHA aumentavam com a concentração de glucose, atingindo o valor máximo para uma concentração de glucose de 9% para a qual a concentração de DHA era cerca de 1 gL^{-1} após 48 h.

Wu et al. (2005) estudaram o efeito da concentração inicial de glucose ($5\text{-}80 \text{ gL}^{-1}$) na biomassa, lípidos e DHA de *Schizochytrium* sp. S31 e concluíram que um aumento da concentração de glucose no meio se traduzia num aumento da concentração de biomassa. As concentrações de lípidos e de DHA também aumentavam com a concentração inicial de glucose do meio até 20 gL^{-1} , atingindo valores de $2,43 \text{ gL}^{-1}$ e $0,318 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente, para esta condição.

Recentemente, Zhu et al. (2008) obtiveram uma concentração de DHA de $1,78 \text{ gL}^{-1}$ com *S. limacinum* utilizando uma concentração de glucose de 30 gL^{-1} , em cinco dias e Ganuza et al. (2008) que determinaram que a concentração máxima de glucose para crescimento de *Schizochytrium* sp. G13/2S estava compreendida entre 100 e 200 gL^{-1} .

Kamlangdee & Fan (2003) estudaram o crescimento e a produção de DHA por cinco estirpes de *Schizochytrium* (N-1, N-2, N-5, N-6 e N-9) num meio contendo 60 gL^{-1} de glucose e concluíram que a estirpe N-2 apresentava uma concentração de biomassa superior ($13,2 \text{ gL}^{-1}$) e maior teor em DHA (203 mg/g biomassa seca).

Em bioreactor de 2 L, Bowles et al. (1999) obtiveram $2,17 \text{ gL}^{-1}$ de DHA utilizando *S. mangrovei* G13 e uma concentração de glucose de 40 gL^{-1} (107 h), enquanto Fan et al. (2001) obtiveram um valor superior ($2,762 \text{ gL}^{-1}$) para *S. mangrovei* KF6, utilizando 60 gL^{-1} de glucose em *erlenmeyer* às 52 h.

Também em bioreactor, *S. limacinum* pode produzir $13,3 \text{ gL}^{-1}$ de DHA para concentrações de glucose elevadas (120 gL^{-1}) em 96 h (Yaguchi et al., 1997).

Em bioreactor, tal como em frasco agitado, num meio contendo 60 gL^{-1} de glucose, Nakahara et al. (1996) obtiveram uma produtividade em DHA de $2 \text{ gL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ com *Schizochytrium* sp. SR21. Yokochi et al. (2003) também cultivaram esta estirpe em bioreactor utilizando meios de cultura contendo concentrações elevadas de glucose ($60\text{-}150 \text{ gL}^{-1}$) e obtiveram $3,1 \text{ gL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para uma concentração de glucose de 150 gL^{-1} .

A glucose também foi referida como um dos melhores substratos para a produção de biomassa e DHA por *thraustochytrids* (estirpe ATCC 34304, Bajpai et al., 1991a; estirpes ATCC 34304, ATCC 28210 e ATCC 24473, Li & Ward, 1994; estirpe ATCC 34304, Iida et al., 1996; estirpes ATCC 34304 e ATCC 28210, Kendrick & Ratledge, 1992; estirpe KK 17-3, Huang et al., 2001; estirpe S31, Wu et al., 2005; estirpe ONC-T18, Burja et al., 2006).

Para a estirpe *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304, Bajpai et al. (1991a) verificaram que um aumento da concentração de glucose no meio (de 5 para 20 gL⁻¹) se traduzia num aumento do teor em lípidos na biomassa (de 2,7 para 16,5%) e num aumento da concentração em DHA (de 26 para 270 mgL⁻¹) em seis dias, sem que a percentagem de DHA nos lípidos fosse alterada; para concentrações de glucose superiores a 20 gL⁻¹, o crescimento de *Thraustochytrium aureum* era inibido. No entanto, de acordo com Ward & Singh (2005), a concentração mínima de glucose que provoca inibição do crescimento de *Thraustochytrium aureum* era 10 gL⁻¹.

Num estudo de optimização do meio de cultura de *Thraustochytrium aureum* em frasco agitado, Iida et al. (1996) obtiveram 5,7 gL⁻¹ de biomassa e 460 mgL⁻¹ de lípidos em 69 h para uma concentração de glucose de 10 gL⁻¹, o que, em termos de produtividade em biomassa, corresponde quase ao dobro do valor obtido por Kendrick & Ratledge, 1992 (4,0 gL⁻¹ em 72 h, para uma concentração de glucose de 30 gL⁻¹).

A glucose também foi considerada a fonte de carbono mais promissora para o crescimento e produção de DHA por *Thraustochytrium* sp. KK17-3. Huang et al. (2001), obtiveram uma concentração de biomassa de 5,5 gL⁻¹ e uma concentração de DHA de 145 mgL⁻¹ em 3 dias.

Burja et al. (2006) estudaram o crescimento e a produção de DHA por *Thraustochytrium* ONC-T18 em glucose (5-160 gL⁻¹) durante 3 dias. Verificaram que a concentração de DHA aumentava com o aumento da concentração da fonte de carbono até 100 gL⁻¹ e obtiveram uma concentração de DHA máxima (4 gL⁻¹) para esta concentração de glucose, valor bastante superior aos obtidos por Bajpai et al. (1991b) (0,27 gL⁻¹ em 6 dias) com *Thraustochytrium aureum* e por Li & Ward (1994) com *Thraustochytrium roseum* (0,41 gL⁻¹ em 5 dias).

Ulkenia sp. também cresce em glucose (estirpes SAM 2180 e SAM 2179, Tanaka et al., 2007). Cultivadas em reactor de 5 L, em meio contendo 60 gL⁻¹ de glucose, as estirpes SAM 2180 e SAM 2179 produzem, respectivamente 4 e 5,5 gL⁻¹ de

DHA que correspondem a 28,7 e 46,2 % do total dos ácidos gordos e a concentrações de biomassa de 23,2 e 19,5 gL⁻¹, respectivamente, em três dias (Tanaka et al., 2007).

Fontes de carbono alternativas

As vantagens, se as houver, de utilizar substratos alternativos em fermentação serão o aumento da produtividade e/ou a redução dos custos totais. Se o processo, utilizando matérias-primas alternativas, trazer vantagens adicionais para a recuperação do produto ou para o tratamento de efluentes, esses serão incentivos extra para a alteração do substrato. Isto significa que as vantagens ou desvantagens da utilização de matérias-primas alternativas não estão exclusivamente associadas aos custos do processo de produção do produto (Sijtsma et al., 2005).

A utilização de substratos alternativos também pode permitir contornar patentes que especifiquem a utilização de um determinado substrato como matéria-prima (Sijtsma et al., 2005).

Ácido acético

O ácido acético é produzido em grande escala pela indústria petroquímica e é vendido a um preço que é aproximadamente o triplo do da glucose, 340 €/t (Sijtsma et al., 2005). Tal como a glucose, é solúvel em água e pode ser utilizado na produção de alimentos destinados ao consumo humano.

A utilização do ácido acético em fermentação requer cuidados especiais no manuseamento de soluções concentradas. Apesar de não ser considerado um “ácido forte” e de não ser tão agressivo como ácidos inorgânicos tais como o clorídrico ou o nítrico, qualquer projecção, derrame ou contacto com a pele têm de ser tratados de imediato (Sijtsma et al., 2005). Ao contrário do que acontece com a glucose, o ácido acético é tóxico para as células em concentrações superiores a 1-2% (Sijtsma et al., 2005) o que torna impraticáveis fermentações em *batch* – concentrações de substrato desta ordem de grandeza traduzir-se-iam na obtenção de baixas concentrações de biomassa. Por outro lado, na opção por cultivos em *fed-batch*, a adição do substrato (ácido acético) é auto-esterilizante e reduz o risco de contaminações (Sijtsma et al., 2005).

Quando adicionado ao meio de fermentação, o ácido acético tem de ser neutralizado ou, pelo menos, o pH terá de ser corrigido para o pH de fermentação. Isto significa que será adicionado um contra-íão, geralmente Na⁺ ou K⁺. À medida que as

células crescem o ião acetato, CH_3COO^- , é consumido e substituído por iões hidróxilo, OH^- , e o pH sobe. Este aumento do pH é responsável pela paragem do crescimento celular (Sijtsma et al., 2005) e terá de ser evitado por adição de um ácido.

Ratledge et al. (2001a) e de Swaaf et al. (2003c) descreveram a utilização do ácido acético como fonte de carbono para a produção de DHA por *Cryptocodinium cohnii* ATCC 30772 em culturas *fed-batch*. Quando a velocidade de alimentação é controlada através do pH da cultura, uma alimentação de ácido acético 50% (m/m) traduz-se numa produtividade volumétrica de DHA superior à obtida com uma alimentação 50% (m/v) de glucose ($38 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$ e $14 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente) (de Swaaf et al., 2003c). Quanto mais depressa crescer o organismo, mais rápida será a adição de ácido acético, permitindo ao microrganismo crescer sempre à taxa específica máxima de crescimento (Sijtsma et al., 2005). Este conceito foi enunciado pela primeira vez por Martin e Kempfling e o sistema de fermentação que nele se baseia é denominado “phauxostat” (Sijtsma et al., 2005). Ratledge et al. (2001a) obtiveram uma produtividade em DHA de $36 \text{ mgL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 98 h de cultivo numa cultura de pH-auxostat.

A produtividade em DHA aumenta de $38 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$ para $48 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$, quando se emprega ácido acético puro em vez de ácido acético 50% (m/m) (de Swaaf et al., 2003 c). As vantagens do ácido acético em relação à glucose para a produção de DHA por *C. cohnii* podem ser explicadas através do metabolismo da acetil-CoA (ponto de partida da biossíntese de ácidos gordos). Durante o crescimento em glucose é necessário exportar a acetil-CoA da matriz mitocondrial para o citosol para a tornar disponível para a síntese de lípidos enquanto o acetato pode ser directamente activado a acetil-CoA pela acetil-CoA sintetase no citosol (de Swaaf et al. 2003 c). Além disso, nesta cultura, o pH é mantido por adição de ácido acético o qual funciona também como fonte de carbono. Esta estratégia pode evitar a acumulação de ácido acético no meio evitando os efeitos inibitórios de elevadas concentrações de acetato (Ratledge et al., 2001a).

O cultivo de *C. cohnii* num meio contendo ácido acético/acetato como fonte de carbono foi patenteado por Ratledge e colaboradores (2001b). O acetato era fornecido, e repostado, por adição de ácido acético ao meio de crescimento em resposta ao aumento de pH resultante do consumo de ácido acético/acetato. Neste processo, não era necessária a imposição de uma fase estacionária para produção de DHA.

A conversão do ácido acético em biomassa nos sistemas pH-auxostat foi estimada em cerca de 0,13 g de biomassa/g ácido acético (de Swaaf et al., 2003 c).

Etanol

O etanol pode ser obtido por fermentação da glucose (obtida a partir do amido de milho ou da cana-de-açúcar) e, como tal, o seu custo é superior ao da glucose. Também pode ser produzido pela indústria petroquímica (*fuel-grade*), e vendido a cerca de 121 €/t (Sijtsma et al., 2005). É produzido em grande escala por fermentação em países como o Brasil, Nova Zelândia e Estados Unidos da América (Sijtsma et al., 2005).

Para a produção de DHA é necessário utilizar etanol com um grau de pureza adequado a aplicações alimentares (*food-grade*), vendido a cerca 300 €/t (Sijtsma et al., 2005) ou seja, cerca de 80-90% do preço do ácido acético.

O facto do etanol ser muito inflamável faz com que seja perigoso armazená-lo ou transportá-lo na forma concentrada. Além disso, a utilização de etanol a nível industrial necessita de fiscalização por parte das autoridades competentes de forma a garantir que a substância não é utilizada para fins diferentes dos previstos (Sijtsma et al., 2005).

A utilização de etanol como fonte de carbono por *C. cohnii* ATCC 30772 foi estudada por de Swaaf et al. (2003 b) em frasco agitado (concentrações de 0, 5, 10, 15 e 25 gL⁻¹). Os autores concluíram que a alga crescia para concentrações de etanol de 5 e 10 gL⁻¹ com uma taxa específica de crescimento de 0,05 h⁻¹ embora as culturas crescidas com 10 gL⁻¹ de etanol apresentassem uma maior fase de adaptação. Não observaram crescimento na condição com 0 gL⁻¹ de etanol e, para concentrações de 15 gL⁻¹ de etanol e superiores, verificaram que o crescimento de *C. cohnii* era claramente inibido pelo substrato.

Tal como o ácido acético, o etanol também é tóxico para a maioria das células em concentrações superiores a 1-2% (Sijtsma et al., 2005) o que torna impraticáveis fermentações em *batch* pelas razões referidas anteriormente.

Sendo um desinfectante, o etanol reduz o risco de contaminações em fermentações *fed-batch* (Sijtsma et al., 2005). Utilizando este modo de operação e uma alimentação de etanol puro, de Swaaf et al. (2003 b) obtiveram uma produtividade volumétrica de DHA de 53 mgL⁻¹h⁻¹ numa cultura de *C. cohnii* ATCC 30772 isto é, uma produtividade em DHA superior à obtida utilizando glucose como substrato (19 mgL⁻¹h⁻¹ (de Swaaf et al., 1999)).

Comparativamente às culturas crescidas em glucose a taxa específica de crescimento em etanol (estimada nas primeiras 52 h) foi ligeiramente inferior 0,047 h⁻¹

(de Swaaf et al., 2003b). Comparando os resultados obtidos no crescimento de *C. cohnii* em etanol (de Swaaf et al., 2003b) e em ácido acético (de Swaaf et al., 2003c) conclui-se que o teor em DHA nos lípidos é praticamente o mesmo para as duas fontes de carbono. Apesar do teor em lípidos ser maior nas culturas crescidas em ácido acético, o facto do crescimento ser mais rápido em etanol resulta numa produtividade superior neste substrato (de Swaaf et al., 2003b).

O etanol apresenta algumas vantagens em relação ao ácido acético como substrato para fermentação a nível industrial: o valor calculado para o rendimento biomassa/substrato (0,31 g de biomassa/g etanol) foi cerca de 2,4 vezes superior ao calculado utilizando ácido acético como substrato, pelo que é necessária menor quantidade de etanol do que de ácido acético para atingir a mesma concentração de biomassa; o preço do etanol é mais baixo que o do ácido acético; o facto de ser menos corrosivo reduz o investimento capital e os custos de manutenção do equipamento de fermentação (de Swaaf et al., 2003b).

Glicerol

O glicerol é o maior subproduto da indústria de biodiesel (Pyle & Wen, 2007; Pyle et al., 2008). É também um subproduto da indústria dos sabões (Arruda et al., 2007).

Durante o processo de produção de biodiesel, os óleos/gorduras reagem com um álcool (geralmente metanol) na presença de catalisadores alcalinos (geralmente bases como o hidróxido de sódio ou de potássio), para formar ésteres de ácidos gordos (biodiesel) e glicerol (Chisti, 2007; Pyle, 2008).

A produção de 100 kg de biodiesel origina cerca de 10 kg de glicerol bruto (*crude glycerol*) (Pyle & Wen, 2007). Com o crescimento ímpar verificado na indústria de biodiesel, o preço do glicerol bruto (glicerina) desceu de cerca de 44 €/kg (2004) para 4,7-9,3 €/kg (2006) estimando-se que estabilize em 0,075 €/kg (Pyle, 2008). Atendendo a que a refinação deste glicerol tem um custo de 0,3 €/kg e que o volume de produção excede a procura de glicerol purificado (Pyle, 2008), a purificação do glicerol bruto não constitui uma alternativa economicamente viável. Pelo contrário, novas aplicações deste subproduto, nomeadamente como substrato em fermentação, constituem uma mais-valia em termos económicos.

Embora existam referências ao crescimento de *C. cohnii* em glicerol (Beam & Himes, 1980), de acordo com de Swaaf e colaboradores (1999), o crescimento utilizando este substrato é marginal ou inexistente.

Contudo, *Schizochytrium limacinum* SR21 cresce em frascos agitados utilizando glicerol como substrato. Yokochi et al. (1998) obtiveram, para esta estirpe e para uma concentração de glicerol de 12% (m/v), uma concentração máxima em DHA de 4,15 gL⁻¹ (mais de 30 % do total dos ácidos gordos), semelhante ao obtido utilizando glucose. O glicerol também se revelou promissor como substrato para a produção de DHA por *Schizochytrium mangrovei* SK-02. Ao estudarem a produção de DHA por este microrganismo em frascos agitados, utilizando diferentes fontes de carbono (frutose, galactose, glucose, glicerol e manose), Unagul et al. (2005) obtiveram um maior teor em DHA (28% m/m) nas células crescidas em glicerol.

Recentemente, Zhu et al. (2008), num estudo de diferentes fontes de carbono para a produção de DHA por *S. limacinum* OUC88, também obtiveram valores de biomassa e DHA similares para as culturas crescidas em glicerol e em glucose.

Chi et al. (2007) descreveram a utilização de glicerol bruto (subproduto da indústria de biodiesel) por *Schizochytrium limacinum* na produção de DHA. Em condições optimizadas, obtiveram concentrações máximas de 4,91 gL⁻¹ e 22,1 gL⁻¹ em DHA e em biomassa, respectivamente.

Pyle (2008) investigou a produção de DHA por *Schizochytrium limacinum* utilizando glicerol bruto como substrato. Cultivou a alga com 9% (90 gL⁻¹) de glucose, com 90 gL⁻¹ glicerol puro e 90 gL⁻¹ de glicerol bruto (aproximadamente 75 gL⁻¹ de glicerol) e verificou que a taxa específica máxima, a concentração de biomassa e a produtividade em DHA eram superiores nas culturas crescidas em glicerol bruto (0,685 d⁻¹, 18,04 gL⁻¹ e 0,51 gL⁻¹d⁻¹, respectivamente) comparativamente à culturas crescidas em glicerol puro (0,562 d⁻¹, 14,43 gL⁻¹ e 0,42 gL⁻¹d⁻¹, respectivamente). A composição em ácidos gordos foi semelhante para as três culturas correspondendo o teor total de ácidos gordos totais a cerca de metade da concentração de biomassa. Apesar do teor em DHA nas culturas ser similar, o facto da cultura com glicerol puro atingir menor concentração de biomassa, fez com que a concentração de DHA e a produtividade fossem menores para esta condição. O perfil em ácidos gordos foi similar ao descrito anteriormente para esta alga (Yokochi et al., 1998; Nakahara et al., 1996).

Pyle (2008) observou inibição pelo substrato para concentrações de glicerol bruto de 100 gL⁻¹ (cerca de 85 gL⁻¹ de glicerol), valor inferior ao da concentração

ótima para produção de biomassa e DHA (90-120 gL⁻¹), descrito por Yokochi et al. (1998) e obteve concentrações de biomassa e de DHA mais baixas que estes autores. Segundo Pyle (2008), esta diferença de resultados pode dever-se ao facto de terem sido utilizadas percentagens diferentes de água do mar nos dois estudos.

Jakobsen et al. (2008) cresceram o thraustochitrid *Aurantiochytrium* sp., estirpe T66, em glicerol e obtiveram uma produtividade volumétrica de DHA de 93 mgL⁻¹h⁻¹ em condições optimizadas (limitação de azoto e de oxigénio), valor que se aproxima dos máximos obtidos para outros thraustochytrids, por exemplo, 138 mgL⁻¹h⁻¹ para *Schizochytrium limacinum* SR21 em glucose (Yaguchi et al., 1997), 115 mgL⁻¹h⁻¹ para *Schizochytrium mangrovei* Sk-02 em glucose (Unagul et al., 2006) e 117 mgL⁻¹h⁻¹ para a estirpe 12B, também em glucose (Perveen et al., 2006).

De acordo com Tanaka et al. (2007), *Ulkenia* também utiliza glicerol como fonte de carbono.

Acetato de sódio

Como já foi referido anteriormente (2.2.1) a síntese de ácidos gordos é um processo que ocorre no citosol e tem como ponto de partida o acetil-CoA. Os mecanismos pelos quais o acetil-CoA é fornecido dependem da fonte de carbono utilizada no crescimento e do organismo (de Swaaf, 2003). Apesar da base bioquímica da produção de lípidos microbianos ter sido elucidada, os trabalhos foram quase exclusivamente, realizados em leveduras, tendo-se assumido tacitamente que o mesmo se aplicava a outros organismos eucariontes (Wynn et al., 2001).

Em teoria, o acetil-CoA pode ser fornecido directamente ao citosol, crescendo os microrganismos em compostos em C₂ como o acetato. A conversão do acetato em acetil-CoA envolve uma reacção enzimática catalisada pela acetil-CoA sintetase (de Swaaf, 2003). Assim, parece interessante investigar a aplicação de compostos em C₂ como fontes de carbono para a acumulação de lípidos em eucariontes oleaginosos.

Vazahappily & Chen (1998) referiram que *C. cohnii*, tal como outras algas, é capaz de crescer em acetato de sódio mas apenas se as concentrações deste forem baixas (1 gL⁻¹ ou inferiores). Contudo, o aumento de pH que acompanha o crescimento neste substrato traduz-se em baixos rendimentos em biomassa (Sijtsma et al., 2005).

Ratledge et al. (2001a) estudaram o crescimento de *C. cohnii* ATCC 30772 em meios contendo diferentes concentrações iniciais de acetato de sódio (1-16 gL⁻¹) e utilizaram ácido acético (50%) para manter o pH a 6,5 num sistema pH-auxostat.

Obtiveram maior densidade celular e maior teor em lípidos para 8 gL⁻¹ de acetato de sódio, às 140 h sem que a concentração de substrato afectasse significativamente a percentagem de DHA (40-50% do total dos ácidos gordos), tendo registado apenas pequenas variações no teor de lípidos (45-50% da biomassa) para concentrações iniciais de acetato de sódio até 12 gL⁻¹. Globalmente, este sistema permite obter produtividades em lípidos e em DHA de 78 e 36 mgL⁻¹h⁻¹, respectivamente, calculadas às 78 h de cultivo que são superiores às descritas utilizando glucose como substrato.

Ulkenia também pode utilizar acetato de sódio como fonte de carbono (Tanaka et al., 2007).

Outras fontes de carbono

C. cohnii é capaz de crescer em galactose mas não em sacarose (de Swaaf et al., 1999). De acordo com Beam & Himes (1980) não cresce em frutose, maltose, ramnose, arabinose, lactose, ácido galaturónico, peptina e aldose, o que está em desacordo com a patente de Takeuchi et al. (1994), a qual refere que a frutose e a galactose podem ser assimiladas como fonte de carbono.

De acordo com o processo patenteado pela Kawasaki Steel Corporation (Borowitzka, 1995), *C. cohnii* pode também ser incubada num meio contendo óleo de peixe, óleo de soja ou lactato como fonte de carbono.

Schizochytrium limacinum SR 21 cresce em frutose onde apresenta um teor de DHA no total dos ácidos gordos de 30,9%, semelhante ao obtido com glucose (32,5%) (Yokochi et al., 1998). A utilização de substratos como o ácido oleico e o óleo de linhaça produz teores elevados de ácidos gordos mas baixos teores em DHA, inferiores a 10 % (Yokochi et al., 1998). Dissacáridos (sacarose, lactose e maltose) e polissacáridos (amido) não são efectivos como substratos para crescimento (Yokochi et al., 1998).

Schizochytrium mangrovei Sk-02 também cresce em frutose, galactose e manose (Unagul et al., 2005). Esta estirpe apresenta, contudo, um crescimento reduzido quando dissacáridos como a maltose e lactose são fornecidos como fonte de carbono (Unagul et al., 2005).

Yamasaki et al. (2006) descreveram o crescimento de *Schizochytrium* sp. KH105 num efluente da produção de Shochu (bebida alcoólica japonesa) suplementado com glucose.

Fan et al. (2000) testaram vários efluentes da indústria alimentar: resíduos da indústria de produção de leite de soja, resíduos da indústria de produção de cerveja e cêdeas de pão no crescimento de *Shizochytrium mangrovei* KF6 tendo verificado que o microrganismo cresce e metaboliza açúcares simples e ácidos gordos com 18 átomos de carbono, nomeadamente ácido esteárico, oleico e linoleico. De acordo com os autores, embora o rendimento em DHA (6,2-12,3 mgg⁻¹) obtido com os efluentes seja muito inferior ao obtido com glucose (203 mgg⁻¹), os thraustocytrids podem aumentar o valor nutritivo dos efluentes e estes poderão ser utilizados em aquacultura e avicultura.

Barclay (1994) testou diferentes fontes de carbono (dextrina, sorbitol, frutose, lactose, maltose, e amidos de milho, de batata e de trigo), em substituição da glucose (5 gL⁻¹) no crescimento de *Schizochytrium* sp. S31 e *Thraustochytrium* sp. U42-2. Verificou que ambos os microrganismos crescem em dextrina, *Schizochytrium* sp. cresce em frutose e *Thraustochytrium* sp. cresce em maltose e nos amidos.

Contrariamente ao que acontece com *Schizochytrium limacinum*, *T. aureum* ATCC 34304 cresce bem em maltose e amido (Bjapai et al., 1991b); Li & Ward, 1994). *T. roseum* (ATCC 28210) cresce em amido e as concentrações em biomassa e em DHA aumentam com o aumento da concentração da fonte de carbono até 25 gL⁻¹ (Li & Ward, 1994).

Kuman et al. (2005) cresceram algumas estirpes (L4, L25, L29 e S3-2) do género *Labyrinthula* utilizando óleo de soja e lecitina de soja como fontes de carbono. Verificaram que a produção de ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa era superior para as células crescidas em lecitina de soja e, em condições optimizadas obtiveram 2,91 gL⁻¹ de PUFAs de cadeia longa ao fim de 21 dias com a estirpe L25.

Kuman et al. (2006) verificaram que a estirpe L72 do género *Labyrinthula* também crescia utilizando óleo de soja e lecitina de soja como fontes de carbono; quando 20 gL⁻¹ de lecitina de soja foram adicionadas ao meio de cultura foram produzidos 0,67 gL⁻¹ de DHA em 14 dias.

De acordo com Tanaka et al. (2007) *Ulkenia* pode metabolizar hidratos de carbono como a frutose, xilose, sacarose, maltose, amido, fucose, glucosamina, dextrano, ácido oleico, ácido glutâmico, óleo de soja, melão e manitol.

Embora alguns autores tenham utilizado xarope de alfarroba como fonte de carbono em culturas microbianas (Calixto & Cañellas, 1982; Roseiro et al., 1992; Albergaria et al., 1999) (Anexo 1), não existem referências à sua utilização para produção de PUFAs.

2.5.3.1.2 Fontes de azoto (N)

O azoto é um macronutriente essencial ao crescimento das algas (Chen & Chen, 2006). Existem dois tipos de fonte de azoto, as simples que incluem o nitrato e a ureia, e as complexas como o extracto de levedura, triptona e o *corn steep liquor* que fornecem também amino-ácidos, vitaminas e factores de crescimento (Wen & Chen, 2001a; 2005; Chen & Chen, 2006). Atendendo a que a concentração das fontes de azoto complexas no meio de cultura é normalmente baixa a sua contribuição para os custos não é significativa comparativamente aos custos da fonte de carbono (Wen & Chen, 2005).

A concentração em azoto no meio de cultura afecta a proporção entre os ácidos gordos saturados e insaturados em algas, bactérias e fungos (Yongmanitchai & Ward, 1989).

Para microrganismos heterotróficos, não é só a concentração de azoto que controla a produção de lípidos mas também a concentração de carbono (Yongmanitchai & Ward, 1989) já que a razão C/N determina a síntese proteica ou a síntese de lípidos (Wen & Chen, 2003; 2005). Uma razão C/N elevada geralmente favorece a acumulação de lípidos, a qual é, em geral, uma resposta à depleção de N no meio de cultura (Wen & Chen, 2005; Hinzpeter et al., 2006). Contudo, Chen & Johns (1991) verificaram que uma razão C/N elevada diminuía a proporção de ácidos gordos insaturados nas células de *Chlorella sorokiniana*.

Para razões C/N superiores, o carbono é fornecido em excesso e o aumento do conteúdo em lípidos pode explicar-se por um mecanismo de armazenamento de carbono nas células (Chen & Johns, 1991). Contudo, visto que a privação de azoto limita o crescimento celular, o conteúdo em lípidos pode aumentar e, globalmente, a eficiência do processo diminuir pelo facto da concentração em biomassa ser menor. Na prática, aumenta-se o rendimento colhendo a biomassa no início da fase de carência de azoto (Cobelas, 1989).

A importância do azoto na produção de PUFA ω -3 foi demonstrada para várias espécies microalgais (Bajpai et al., 1991b; Yongmanitchai et al., 1991; Molina Grima et al., 1992; Singh & Ward, 1996; Yokochi et al., 1998) e parece ser específica para cada espécie (Wen & Chen, 2001a).

De Swaaf et al. (1999) obtiveram um óptimo de 2 gL^{-1} para a concentração de extracto de levedura, utilizada como única fonte de azoto para o crescimento de *C. cohnii* em frasco agitado, numa gama de concentrações de $0\text{-}10 \text{ g L}^{-1}$. Para

concentrações de extracto de levedura superiores o teor lipídico das células diminuiu drasticamente.

Mendonza et al. (2008) obtiveram uma concentração de ácidos gordos 3,18 vezes superior e uma concentração de DHA 2,04 vezes superior em culturas de *Cryptocodinium cohnii* (CCMP 316) em condições de supressão de azoto, comparativamente aos valores obtidos nas condições controlo (meio f/2 + NPM). De acordo com os mesmos autores, as variações observadas no tamanho e massa das células na condição em que foi imposta a limitação de azoto, indicam claramente uma alteração metabólica em que passou a predominar a acumulação de substâncias de reserva face à divisão celular. Esta alteração metabólica foi acompanhada de perda de mobilidade celular (Mendoza et al., 2008).

Yokochi et al. (1998) obtiveram um teor total de ácidos gordos superior quando o *corn steep liquor* era utilizado por *Schizochytrium* como fonte de azoto comparativamente a outras fontes de azoto orgânicas como extracto de levedura, polipeptona e triptona. Não registaram diferenças significativas na composição em ácidos gordos das células crescidas com extracto de levedura e com *corn steep liquor* e obtiveram uma concentração máxima de DHA de $1,7 \text{ gL}^{-1}$ em *corn steep liquor*. Os autores estudaram também a utilização de várias fontes inorgânicas de azoto (sulfato, acetato e nitrato de amónio, nitrato de sódio e ureia). *Schizochytrium* cresceu com todas estas fontes de azoto tendo-se o acetato de amónio mostrado ligeiramente superior. Estudando o efeito da concentração de acetato de amónio no crescimento e na produção em DHA, os autores concluíram que a concentração de biomassa aumentava com o aumento da concentração de acetato de amónio até $2,3 \text{ gL}^{-1}$ e que o teor em ácidos gordos diminuía com o aumento da concentração de acetato atingindo o valor mais elevado (superior a 50%) para a concentração mais baixa de acetato de amónio. As condições de cultura com concentração de azoto mais baixa também apresentavam menor crescimento celular e, portanto, menor produção global de ácidos gordos (Yokochi et al., 1998). A produção máxima de ácidos gordos e de DHA ocorreu para $1,2 \text{ gL}^{-1}$ de acetato de amónio.

Burja et al. (2006) verificaram que, à medida que a concentração de azoto diminuía no meio de cultura, o teor total de ácidos gordos aumentava nas culturas de *Thraustochytrium* sp. ONC-18 atingindo um máximo (aproximadamente 80%) para concentrações de 1% (m/v) de extracto de levedura e/ou glutamato monossódico. Contudo, as culturas com concentração de azoto mais baixa também apresentavam um

crescimento e uma produção de ácidos gordos limitados. Utilizando uma concentração de 8 gL^{-1} de glutamato monossódico e 2 gL^{-1} de extracto de levedura obtiveram $26,1 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa e $4,5 \text{ gL}^{-1}$ de DHA, em 3 dias.

Yamasaki et al. (2006) descreveram o crescimento de *Schizochytrium* sp. KH105 num efluente da produção de *shochu* em que a(s) fonte(s) de azoto eram fornecidas pelo efluente. Em fermentador (3L) em condições semi-otimizadas obtiveram-se $3,4 \text{ gL}^{-1}$ de DHA em 4 dias, valor equivalente ou superior aos obtidos noutros estudos utilizando desperdícios alimentares (Fan et al., 2000; 2001).

Em frascos agitados com deflectores de fluxo e, fixando uma razão peptona/extracto de levedura de 2:1 (m/m), Yamasaki et al. (2007) obtiveram uma produtividade máxima em DHA (para uma concentração total de azoto de 3% na gama de concentrações estudada (1,5-7,5%)) com *Schizochytrium* sp. KH105.

Recentemente, Zhu et al. (2008) verificaram que o hidrolisado de soja (*soybean cake hydrolysate*), era um subproduto de baixo custo e efectivo como fonte de azoto para a acumulação de DHA por *Schizochytrium limacinum* OUC88. Verificaram também que, embora um aumento da concentração da fonte de carbono se traduzisse num aumento da concentração de biomassa, a acumulação de DHA nas células era sobretudo determinada pela razão C/N no meio. Obtiveram uma concentração máxima de DHA de $4,08 \text{ gL}^{-1}$ após 5 dias de cultura em *erlenmeyer* num meio contendo 60 g L^{-1} de glucose e 20 g L^{-1} de hidrolisado de soja.

Barclay (1994) testou a utilização de diferentes fontes de azoto por *Thraustochytrium* sp. U42-2 e *Schizochytrium* sp. S31 substituindo o glutamato (5 gL^{-1}) por *gelysate*, peptona, triptona, caseína, *corn steep liquor*, ureia, nitrato, amónio, soro de leite e *corn gluten meal*. Ambas as espécies metabolizaram fontes de azoto como *gelysate*, *corn steep liquor*, soro de leite e *corn gluten meal*. *Schizochytrium* sp. utilizou também fontes de azoto como nitrato e amónio ao contrário do que aconteceu com *Thraustochytrium* sp.

Assim, ao contrário de *Shizochytrium* que utiliza fontes de azoto orgânicas e inorgânicas de forma semelhante para a produção de DHA (Yokochi et al., 2003), *Thraustochytrium* spp. prefere fontes de azoto orgânicas tais como o glutamato de sódio (Singh et al., 1996). O extracto de levedura, a peptona e a triptona produzem elevadas concentrações de biomassa mas provocam uma diminuição do teor em DHA na biomassa de *T. aureum* ATCC 34304 e *T. reseaum* ATCC 28210 (Bjapai et al., 1991b; Singh et al., 1996). O extracto de levedura e o *corn steep liquor* constituem

também uma fonte importante de factores de crescimento o que explica que a adição de 2 gL^{-1} de extracto de levedura ao meio contendo glutamato de sódio como fonte de azoto aumente a concentração de biomassa e de DHA em cerca de 30 % numa cultura de *T.roseum* ATCC 28210 (Li & Ward, 1994).

Wu et al. (2005) verificaram que um aumento da concentração de extracto de levedura no meio de cultura de *Schizochytrium* sp. S31 se traduzia num aumento da produção de biomassa e de lípidos atingindo um máximo para 0,4% (m/v) desta fonte de azoto.

Jakobsen et al. (2008) estudaram o efeito da limitação de azoto na acumulação de lípidos pelo thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp., estirpe T66 e verificaram que, depois da exaustão do glutamato (única fonte de N do meio) e mantendo o fornecimento da fonte de carbono, o teor lipídico das células aumentava de 13 para 55% (m/m) e que os teores relativos de DHA e DPA aumentavam ligeiramente durante a fase de acumulação de lípidos atingindo 29 e 8% (m/m) do total de ácidos gordos, respectivamente. Os resultados obtidos por estes autores estão de acordo com as observações anteriores de Yaguchi et al. (1997) e Bowles et al. (1999) segundo as quais uma razão elevada C/N favorece a acumulação de lípidos em thraustochytrids.

Ulkenia sp. pode utilizar fontes de carbono como a peptona, o extracto de levedura, o extracto de malte, o extracto de carne, os casaminoácidos (aminoácidos obtidos por hidrólise da caseína), o *corn steep liquor*, o glutamato de sódio, a ureia e fontes de azoto inorgânicas como o acetato de amónio, o sulfato de amónio, o cloreto de amónio e o nitrato de amónio (Tanaka et al., 2007).

2.5.3.1.3 Elementos traço e vitaminas

Vários iões metálicos incluindo Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} promovem a síntese de ácidos gordos em microrganismos uma vez que participam na biossíntese de ácidos gordos como co-factores de algumas enzimas (Yap & Chen, 2001).

A adição de uma mistura de metais traço contendo Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} ao meio de cultura aumentou a produtividade em DHA de *Thraustochytrium* sp. (Singh et al., 1996).

Embora a vitamina B_{12} não seja um nutriente essencial ao crescimento de *C. cohnii* (Gold & Baren, 1966), a sua adição ao meio de cultura estimulou o crescimento

da alga e traduziu-se numa taxa específica de crescimento e numa concentração de biomassa mais elevadas (Jiang et al., 2001); a concentração de biomassa mais elevada (2,48 gL⁻¹) foi obtida para uma concentração de vitamina B₁₂ de 0,75 µgL⁻¹ às 54 h de cultivo e corresponde à menor percentagem de ácidos gordos saturados (27,49% do total dos ácidos gordos) e à maior percentagem de DHA (64,34% do total dos ácidos gordos) sem que o teor em ácidos gordos tenha sido afectado pelas concentrações de vitamina B₁₂ utilizadas (0; 0,19; 0,75; 3,0 e 6,0 µgL⁻¹).

Iida et al. (1996) também descreveram um aumento na concentração de biomassa de *Thraustochytrium aureum* por adição de uma mistura contendo tiamina, vitamina B₁₂ e sal de sódio do ácido pantoténico.

2.5.3.2 Transferência de oxigénio

A transferência de oxigénio é um parâmetro fundamental em processos biológicos aeróbios dado que a solubilidade do oxigénio é baixa (cerca 6 a 7 mgL⁻¹ em condições normais de fermentação) (Teixeira et al., 2007). Num bioreactor, o arejamento deve fornecer o oxigénio necessário aos microrganismos e a agitação deve manter as condições uniformes dentro do reactor. Ambos os factores são importantes na promoção de uma transferência de massa efectiva para a fase líquida e na redução ou eliminação de gradientes.

A concentração de oxigénio dissolvido numa suspensão de microrganismos depende da taxa de transferência de oxigénio da fase gasosa para o líquido, da taxa de transporte do oxigénio na fase líquida e da taxa de consumo do mesmo pelos microrganismos (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009).

Genericamente, a variação da concentração de oxigénio dissolvido num reactor aeróbio descontínuo é descrita pela equação de balanço de massa:

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR$$

em que

C – concentração de oxigénio dissolvido no reactor;

t – tempo;

OTR – taxa de transferência de oxigénio;

OUR – taxa de consumo de oxigénio

A taxa de consumo de oxigénio pelas células depende da densidade celular ou concentração de células (X) e da taxa específica de consumo de oxigénio (q_{O_2}), como indicado pela equação:

$$OUR = q_{O_2} \cdot X$$

Assim, a partir de uma concentração celular crítica, o oxigénio pode deixar de ser fornecido ao meio de cultura de forma suficientemente rápida para responder às necessidades em oxigénio dos microrganismos. O oxigénio torna-se o substrato limitante do crescimento celular se a capacidade de transferência de oxigénio do sistema (OTR) for menor que a capacidade máxima de consumo de oxigénio da cultura (OUR_{max}) (Teixeira et al., 2007). Nestas condições, o oxigénio torna-se responsável por baixas densidades celulares e produtividades reduzidas.

Devido ao impacto da disponibilidade em oxigénio na produtividade das culturas microbianas, sobretudo nas culturas com elevadas densidades celulares, torna-se importante aumentar a taxa de transferência de oxigénio da fase gasosa para o meio líquido.

Sabe-se que a solubilidade do oxigénio nos meios de cultura é baixa e que, durante uma fermentação, as moléculas de oxigénio contidas nas bolhas de ar introduzidas no reactor enfrentam uma série de resistências em série (figura 13) até serem utilizadas pelas células:

- transferência de massa da bolha para a interface gás-líquido (1);
- transporte através da interface gás-líquido (2);
- difusão através do filme estagnante que rodeia a bolha (3);
- transporte através do líquido (4);
- difusão através do filme de líquido estagnante que rodeia as células (5);
- movimento através da interface líquido-célula (6);
- difusão através do sólido até à célula individual, caso as células estejam associadas em flocos, agregadas ou imobilizadas (7);
- transporte através do citoplasma para o local da reacção (8) (Teixeira et al., 2007).

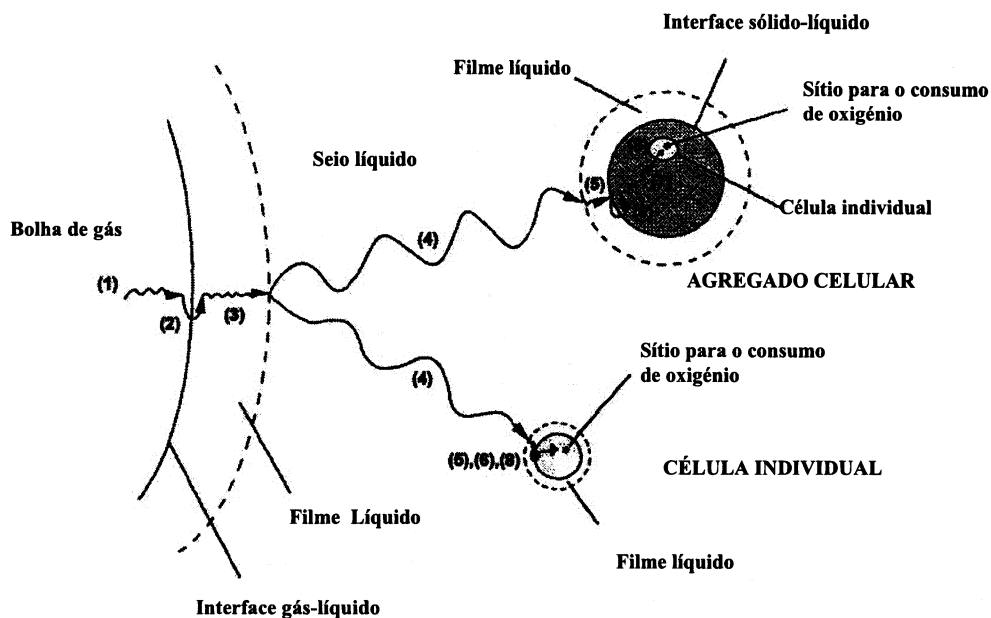


Figura 13 – Fenômenos de transferência de massa que ocorrem durante o transporte de oxigênio da fase gasosa para as células num reactor biológico (Teixeira et al., 2007).

A ordem de grandeza destas resistências permite determinar quais os passos que controlam o fornecimento de oxigênio às células microbianas. Para a maioria das situações podemos afirmar que:

- o filme líquido em torno das bolhas é a principal resistência à transferência de oxigênio;
- em meios de fermentação viscosos, a resistência ao transporte de oxigênio na fase líquida pode ser importante;
- em agregados microbianos, a resistência à transferência de massa no filme líquido em torno do agregado pode ser importante;
- em agregados microbianos, a resistência interna à transferência de massa pode ser muito importante (Teixeira et al., 2007).

De acordo com a teoria dos dois filmes, a taxa de transferência de oxigênio de uma bolha de ar para a fase líquida pode ser descrita pela equação:

$$OTR = k_L a.(C^* - C)$$

onde

- C – concentração de oxigênio dissolvido na fase aquosa;
- C* – concentração de oxigênio dissolvido em equilíbrio com a fase gasosa (concentração de oxigênio correspondente à saturação da fase aquosa);

k_L – coeficiente de transferência de massa;

a – área interfacial (área por unidade de volume de líquido).

A concentração de oxigénio correspondente à saturação da fase aquosa (C^*) é determinada utilizando a lei de Henry:

$$C^* = \frac{[O_2]_{gas}}{H}$$

onde H é a constante de Henry. Na literatura, estão disponíveis correlações empíricas para a sua determinação em função da temperatura (Perry & Green, 1998).

A taxa de transferência de oxigénio (OTR) depende das propriedades físicas do fluido, temperatura, pressão, composição da solução, agitação, velocidade superficial do gás e configuração do reactor (Gomes et al., 2007).

Devido às dificuldades experimentais de determinação de k_L e de a separadamente, o produto $k_L a$, designado por coeficiente volumétrico de transferência de massa é normalmente utilizado para caracterizar a transferência de massa gás-líquido (Teixeira et al., 2007). $K_L a$ é uma medida da capacidade de arejamento do fermentador. Quanto maior $k_L a$, maior é a capacidade de arejamento do sistema nas condições testadas (Stanbury & Whitaker, 1984).

A taxa de transferência de oxigénio de um sistema é função do coeficiente volumétrico de transferência de massa, $k_L a$, e da força motriz (*driving force*) devida à diferença de concentração de oxigénio dissolvido e a concentração de oxigénio nas condições de saturação (Rols et al., 1990).

Para um bioreactor e um meio de cultura específicos é possível aumentar o valor de $k_L a$ e, conseqüentemente OTR, utilizando velocidades de agitação e caudais de arejamento elevados (Gomes et al., 2007). Porém, a obtenção de valores elevados de $k_L a$ por variação destes parâmetros traduz-se num elevado consumo energético, que aumenta significativamente os custos de operação. Elevadas taxas de agitação também apresentam limitações quando aplicadas a células sensíveis ao atrito hidrodinâmico gerado pela excessiva turbulência (Gomes et al., 2007; Teixeira et al., 2007).

Devido à baixa solubilidade do oxigénio no meio de fermentação apenas se conseguem pequenos aumentos da taxa de transferência de oxigénio aumentando o caudal de arejamento, a agitação ou a pressão parcial (Giridhar & Srisvastava, 2000).

Outra hipótese (menos explorada), é a adição ao meio de cultura de uma segunda fase líquida e imiscível onde a solubilidade do oxigénio seja elevada. Ao adicionar uma fase orgânica com maior afinidade para o oxigénio, uma maior quantidade de oxigénio é removida do gás de arejamento e retida no sistema e, apesar de não se conseguir dissolver mais oxigénio que o correspondente à concentração de saturação de cada uma das fases, o fornecimento de oxigénio à fase aquosa é agora suplementado pelo equilíbrio de partição do oxigénio dissolvido da fase orgânica para a fase aquosa (Nielsen et al., 2003b). Assim, a adição de uma fase orgânica permite aumentar significativamente a taxa de transferência de oxigénio do ar para os microrganismos, sem necessidade de intensificar a mistura e, portanto, sem aumentar as necessidades de fornecimento de energia (Rols et al., 1990; Cascaval et al., 2006; Amaral et al., 2008). Deste modo, definem-se como vectores de oxigénio, os compostos que adicionados ao meio de crescimento aumentam a taxa de transferência de oxigénio para os microrganismos por apresentarem uma capacidade para solubilizar oxigénio superior à da água (Rols et al., 1990; Ho et al., 1990; Galaction et al., 2004).

Os vectores de oxigénio mais utilizados em biotecnologia são hidrocarbonetos (Jia et al., 1997; Rols et al., 1990; Ho et al., 1990; Galaction et al., 2005; Giridhar & Srivastava, 2000; Jianlong, 2000; Lai et al., 2002), perfluorocarbonetos (Rols et al., 1990; Menge et al., 2001; Lowe et al., 1998; MacLean, 1977; Elibol, 2001) e os óleos vegetais (Rols & Goma, 1991; Zhao et al., 1999), alguns utilizados como agentes anti-espuma. A solubilidade do oxigénio nestes compostos é 15 a 20 vezes superior à solubilidade em água (Galaction et al., 2004; 2005). Comparativamente aos perfluorocarbonetos, os hidrocarbonetos são mais baratos e, como tal, são mais apropriados para fermentações em grande escala por razões económicas (Ho et al., 1990).

Quando se utilizam vectores de oxigénio, no fermentador estão presentes quatro fases: a fase gasosa (geralmente ar), a fase orgânica líquida, a solução aquosa e a fase sólida (os microrganismos). Nestas condições surgem novas áreas interfaciais entre o gás e a fase líquida e a transferência de oxigénio das bolhas gasosas para as células pode ocorrer por cinco vias esquematizadas na figura 14 (Rols et al., 1990; Galaction et al., 2004). Tal como esquematizado, a transferência de oxigénio pode ocorrer directamente para as células, ou através dos vectores de oxigénio adsorvidos ou não à superfície das bolhas. Além disso, as células podem estar adsorvidas à superfície das bolhas ou às gotas do vector (Galaction et al., 2004).

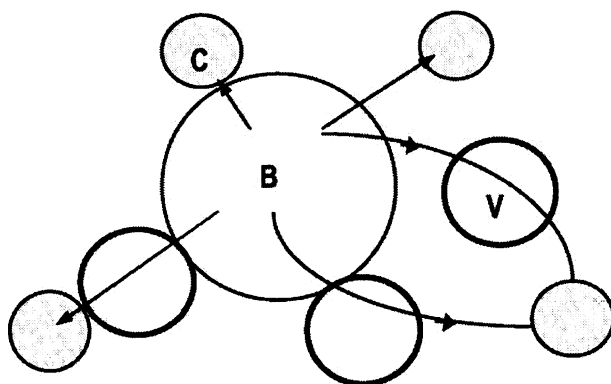


Figura 14 – Mecanismos possíveis para a transferência de oxigênio na presença de vetores de oxigênio (B: bolha, C: célula, V: vector de oxigênio) (Galaction et al., 2004; Rols et al., 1990).

Entre os mecanismos de transferência de oxigênio apresentados na literatura, o mais plausível assume que o hidrocarboneto é adsorvido à superfície das bolhas, com ou sem formação de um filme contínuo, que a difusão do oxigênio do ar para os microrganismos ocorre através do vector de oxigênio e depois através da fase aquosa ou directamente para as células adsorvidas às gotas do hidrocarboneto ou à superfície do filme (Galaction et al., 2004; Cascaval et al., 2006).

A principal resistência à transferência de oxigênio num fermentador com vector de oxigênio é devida à difusão do gás através da camada aquosa adjacente à interface vector-fase aquosa. Contudo, esta resistência à transferência de oxigênio é compensada pelo aumento da área interfacial para a transferência de oxigênio e pela acumulação de oxigênio na fase orgânica (Cascaval et al., 2006). Por esta razão, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio correspondente ao filme aquoso, K_La , pode também ser utilizado para descrever a transferência de oxigênio nestes sistemas (Rols et al., 1990; Galaction et al., 2004; Cascaval et al., 2006).

Na selecção de um vector de oxigênio para a fermentação de um determinado microrganismo há que atender à biocompatibilidade do vector para o microrganismo. A menor toxicidade, ou maior biocompatibilidade, de um composto orgânico para um determinado microrganismo depende da sua hidrofobicidade, a qual é medida através do logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$). O valor de $\log P$ de um solvente é uma previsão da retenção de actividade de um biocatalisador nesse meio orgânico (Hejazi et al., 2002). Geralmente, a retenção de actividade é baixa para solventes com valores de $\log P$ inferiores a 2, não pode ser prevista para solventes com valores de $\log P$ entre 2 e

4 e é elevada para solventes pouco polares e apolares que têm log P superiores a 4 (Hejazi et al., 2002). Sendo os vectores de oxigénio solventes orgânicos, deverão seleccionar-se solventes com elevada afinidade pelo oxigénio e mais biocompatíveis (log P > 4-5) (Heipieper et al., 1994), a fim de evitar a diminuição de produtividade do processo por inibição tóxica das células.

Se o objectivo da fermentação for a produção de um produto solúvel no vector de oxigénio há ainda a considerar a hipótese de o composto produzido pelo microrganismo ser extraído para a fase orgânica. O processo em que a produção e a extracção de um composto produzido por microalgas ocorre em simultâneo foi denominado “milking” (Hejazi, 2003) e foi aplicado com sucesso na intensificação da produção de β -caroteno por *Dunaliella salina* (Hejazi & Eijffels, 2004). Neste caso, no bioreactor estão presentes uma fase aquosa, onde as células crescem, e uma fase para a qual o produto é extraído (Hejazi, 2003). Consoante o produto pretendido seja polar ou pouco polar assim a fase de extracção é aquosa ou orgânica. Teoricamente, a utilização destes sistemas com mais uma fase permite, em simultâneo, a produção e a extracção selectiva de um produto a partir das células de microalgas e traduz-se num aumento da produtividade cuja importância se compreende se se atender a que as baixas produtividades são o maior constrangimento à utilização comercial de microalgas para a produção de compostos de elevado valor acrescentado (Borowitzka, 1999).

Como *C. cohnii* é um organismo aeróbio obrigatório, o seu cultivo requer uma transferência eficiente de oxigénio da fase gasosa para o meio de cultura. De Swaaf et al. (1999) verificaram que um aumento da agitação de 50 para 100 rpm se traduzia num aumento superior a quatro vezes na densidade óptica atingida pelas culturas de *C. cohnii* (ATCC 30772) crescidas em frasco agitado, provavelmente devido ao aumento do fornecimento de oxigénio. De acordo com Mendoza et al. (2008), a disponibilidade de oxigénio no meio de cultura também favorece a acumulação de DHA em *C. cohnii* CCMP 316.

Em fermentadores, é necessário uma mistura vigorosa para assegurar a transferência de oxigénio necessário às culturas com elevada densidade celular. No caso de *C. cohnii*, o processo de transferência de oxigénio complica-se quando as culturas atingem concentrações de biomassa superiores a 10-15 gL⁻¹ devido ao aumento da viscosidade, resultante da produção de polissacáridos extracelulares (de Swaaf et al., 2001). Um meio de fermentação muito viscoso requer um aumento da potência de agitação e pode reduzir a taxa de transferência de oxigénio e dificultar o

desenvolvimento de processos comerciais de obtenção de elevadas densidades celulares. Contudo, a adição de uma preparação comercial de hidrolases de polissacáridos (Glucanex[®]) pode reduzir a viscosidade da cultura e a agitação necessária a uma transferência de oxigénio eficiente (de Swaaf et al., 2003c).

A utilização de grandes fermentadores em vez de tanques mais pequenos tem vantagens em termos económicos mas acarreta algumas complicações operacionais. O aumento de tamanho do fermentador faz aumentar a pressão absoluta na sua parte inferior e, dependendo do tempo de mistura e dos coeficientes de transferência de massa, isso pode resultar num aumento do teor dos gases dissolvidos e afectar o crescimento e a produtividade de *C. cohnii*. Por conseguinte, é necessário assegurar uma mistura adequada que evite a depleção de oxigénio e a acumulação de dióxido de carbono sem sujeitar o organismo a excessivas tensões de corte (Wynn et al., 2005).

A tensão de oxigénio afecta o crescimento e a composição em lípidos de *C. cohnii*. Beach & Holz (1973) verificaram que as células da estirpe GC crescidas com maior disponibilidade de oxigénio se multiplicavam mais rapidamente, continham menos lípidos (em massa) mas estes eram mais insaturados que os das células crescidas com limitação de oxigénio. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente por Harrington and Holz (1968) que haviam referido um aumento da percentagem de ácidos saturados em culturas não agitadas, crescidas em *erlenmeyer* com menor razão área superficial/volume (menor disponibilidade de oxigénio). A substituição do arejamento com ar por azoto traduziu-se na paragem do crescimento, no aumento de volume das células, no aumento dos lípidos e na alteração da composição em ácidos gordos (favorecendo a formação dos ácidos gordos saturados 14:0, 12:0, 18:0 e 10:0) (Beach & Holz, 1973).

Mendonza et al. (2008) também verificaram que a disponibilidade de oxigénio favorecia a acumulação de DHA por *C. cohnii* CCMP 316.

A concentração óptima de oxigénio para a produção de lípidos pelas estirpes *Thraustochytrium* e *Schizochytrium* é de 5-40% da saturação (Barclay, 1994).

Embora, de um modo geral, o aumento da tensão de oxigénio no meio aumente o teor de ácidos gordos insaturados nos microrganismos, no caso de *Schizochytrium* sp. (ATCC 20888) baixos níveis de oxigénio dissolvido no meio de fermentação aumentam o rendimento e a produtividade em DHA (Bailey et al., 2008) e este facto pode ser explicado atendendo à via biossintética anaeróbia presente neste organismo (Metz et al., 2001). Atendendo a estes resultados, Bailey et al., (2008) propuseram um processo de

produção de lípidos polienólicos em que, numa primeira fase de aumento da densidade celular, o oxigénio dissolvido deve ser mantido no mínimo em 4% da saturação e, numa segunda fase de produção de lípidos, o oxigénio dissolvido deve ser no máximo 3% da saturação.

Jakobsen et al. (2008) também verificaram que a limitação de oxigénio aumenta o teor de lípidos do thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. T66. O teor de lípidos das células sujeitas a limitação de oxigénio (oxigénio dissolvido inferior a 1% da saturação após um período inicial de crescimento com arejamento elevado) aumentou de 13% para 33% (m/m) da biomassa seca e o teor relativo de PUFAs aumentou, tendo o DHA e o EPA atingido 52% e 13% (m/m), respectivamente do total dos ácidos gordos. Registou-se ainda uma diminuição dos ácidos gordos mono-insaturados nas células.

2.5.3.3 Temperatura

A biomassa algal reage continuamente à temperatura ambiente. Para além de afectar a velocidade das reacções celulares, a temperatura afecta a natureza do metabolismo, as necessidades nutricionais e a composição da biomassa (Richmond, 1986).

As adaptações fisiológicas das microalgas à temperatura de crescimento são reguladas por características bioquímicas, reacções enzimáticas, permeabilidade e composição celulares. As adaptações do sistema de transporte da membrana e da fluidez da membrana estão relacionadas com a composição em ácidos gordos e desempenham um papel fundamental na resposta à temperatura de crescimento (Jiang & Chen, 2000 b).

Está bem estabelecido que os microrganismos se adaptam fenotipicamente à temperatura de crescimento e que para as temperaturas mais baixas as percentagens de ácidos gordos, sobretudo poli-insaturados, aumentam de forma a garantir a fluidez dos lípidos de membrana (Jiang & Chen, 2000 b). Contudo, a resposta das algas à temperatura é específica da espécie (Richmond, 1986) e os efeitos da temperatura na composição lipídica dependem da temperatura óptima para a espécie em questão (Cobelas, 1989), não existindo por isso uma correlação entre a temperatura e o teor em ácidos gordos poli-insaturados (Renaud et al., 1995).

A temperatura afecta o crescimento celular e a composição em PUFA ω -3 em microalgas (Jiang & Chen, 2000b; Wen & Chen, 2003) mas os óptimos de temperatura para crescimento celular e para formação de produto não são necessariamente coincidentes (Fonseca, 2007).

A taxa específica máxima de crescimento varia com a temperatura de forma análoga à observada com a velocidade de uma reacção enzimática, isto é, aumenta com a temperatura até um determinado valor, observando-se a partir daí um decréscimo acentuado decorrente da desactivação térmica das proteínas (Nielsen, 2003a; Fonseca, 2007), mesmo para temperaturas que excedem o óptimo apenas em dois ou três graus (Richmond, 1986).

A temperatura óptima de crescimento de *C. cohnii* é 27°C (Ishida, 1968, Tuttle & Loeblich, 1975). Jiang and Chen (2000b) estudaram o efeito da temperatura na estirpe *C. cohnii* ATCC 30556 e concluíram que a microalga crescia em toda a gama estudada de temperaturas (15-30°C) tendo obtido uma taxa específica de crescimento superior (0,092 h⁻¹) e uma maior concentração de biomassa (2,42 gL⁻¹, após 56 h de cultivo) à temperatura de 30°C. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente por Beach & Holz (1973) que descreveram uma inibição do crescimento de *C. cohnii* abaixo de 14°C e acima de 31°C e com os de Tuttle & Loeblich (1975) que observaram crescimento de 20 a 35 °C.

Anteriormente, Gold & Baren (1966) já haviam estudado o efeito da temperatura no crescimento de *Cryptocodinium cohnii* isolada nas águas de Porto Rico tendo concluído que a temperatura óptima de crescimento era 30°C e que o crescimento era inibido a 20 e a 35°C. De Swaaf et al. (1999) também obtiveram densidades ópticas superiores para as culturas de *C. cohnii* ATCC 30772 crescidas a 30 °C durante 50 h, comparativamente com as culturas crescidas a 27 °C, durante o mesmo tempo.

Geralmente *C. cohnii* cresce a temperaturas compreendidas entre 15 e 34° C. No entanto, estirpes que cresçam a temperaturas mais elevadas são preferidas para a produção comercial por apresentarem um menor tempo de duplicação, reduzindo o tempo de fermentação (Kyle et al., 1991; Kyle et al., 1995; Kyle et al., 1998; Kyle, 2004).

A temperatura de incubação também afecta a acumulação de lípidos e o teor em DHA (de Swaaf et al., 1999; Jiang & Chen, 2000b).

De Swaaf et al. (1999) obtiveram um teor em lípidos de 13,0 % para as células de *C. cohnii* ATCC 30772 crescidas a 27 °C, durante 50 h, e um teor de 7,8 % para as

células crescidas a 30 °C durante o mesmo tempo; no que respeita à percentagem de DHA nos lípidos, esta foi de 35,9% a 27 °C e de 40,4% a 30 °C. Beach e Holz (1973) obtiveram um teor em lípidos superior nas células de *C. cohnii* crescidas a 31,5 °C (11%) comparativamente ao das células crescidas a 25 °C (8,7%) mas estes autores colheram as culturas crescidas a 31,5 e 25 °C em tempos diferentes (4 e 2 dias, respectivamente) e esse factor pode ter afectado a produção de lípidos.

Jiang & Chen (2000b) concluíram que as células de *C. cohnii* ATCC30556 crescidas a 15°C apresentavam um teor de DHA superior (57,64%) relativamente ao total de ácidos gordos mas uma menor concentração de biomassa pelo que as produtividades eram semelhantes nas culturas crescidas no intervalo de temperaturas 15-25°C. De facto, as temperaturas mais baixas favoreciam a formação de ácidos gordos poli-insaturados de forma a manter a fluidez dos lípidos e as funções próprias da membrana celular (Jiang & Chen 2000b). Os autores testaram ainda crescimentos a 25°C e 30°C (durante 48 h) seguidos de incubação a 15°C (durante 24 h) e concluíram que os valores mais elevados para o teor de DHA na biomassa (6,21%) e para a produtividade (1,47 mgL⁻¹h⁻¹) eram obtidos quando as culturas crescidas a 25°C eram incubadas a 15°C, numa etapa final.

A temperatura óptima de crescimento de *Shchizochytrium limacinum* SR21 é 25°C (Yokochi et al., 1998). Contudo, os processos patenteados por Barclay (1994) referem o crescimento de *Shchizochytrium* entre 5°C e 48 °C, de preferência entre 15-40°C e, ainda preferivelmente entre 25 e 35°C. Leña et al. (2003) também referem a temperatura de 25°C como óptima para a produção de lípidos por *Shchizochytrium mangrovei*, *Shchizochytrium* sp. e *Thraustochytrium* sp.

Pyle (2008), utilizando métodos estatísticos de design experimental, determinou 19,2 °C como temperatura óptima para a produção de DHA por *Schizochytrium limacinum*.

Recentemente, Zhu et al. (2008) estudaram o efeito da temperatura (16 a 37°C) no crescimento e produção de DHA por *Schizochytrium limacinum*; obtiveram maior concentração de biomassa a 23-30°C e um teor de DHA superior nas células crescidas a 16-23°C, resultados que indicam que as temperaturas mais baixas favorecem a acumulação de DHA. A produção máxima de biomassa (13,09 gL⁻¹) e de DHA (1,78 gL⁻¹) foram obtidas a 23°C. No entanto, Nakahara et al. (1996) tinham determinado a temperatura de 28°C como óptima para a produção de DHA pela mesma espécie. Estas

diferenças nas temperaturas óptimas podem resultar das diferentes composições dos meios de cultura (Zhu et al., 2008).

Bowles et al. (1999) estudaram 57 *thraustochytrids* isolados em ambientes diferentes, tendo verificado que os isolados em águas mais frias apresentavam maiores quantidades de DHA.

Bajpai et al. (1991b) determinaram que a temperatura óptima para a produção de DHA por *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 era 28°C e verificaram que temperaturas de incubação mais baixas resultavam num aumento da insaturação dos lípidos deste microrganismo. Estes resultados foram corroborados pelos de Kang et al. (2007) que observaram que o aumento de temperatura (de 25 °C para 30 °C) reduz o teor em PUFAs de *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304.

Hur et al. (2002), ao estudarem o efeito da temperatura (4, 11, 18, 24 e 32 °C) no crescimento e produção de DHA por *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 verificaram que o crescimento era muito lento às temperaturas de 4 e 11 °C, que o teor em lípidos aumentava com a diminuição da temperatura e que o teor de DHA nos lípidos não era significativamente afectado pela temperatura de cultivo e se mantinha praticamente constante ao longo de todo o cultivo (7 dias).

Kumar et al. (2004) patentearam um processo para aumentar o teor em PUFAs de *thraustochytrids* em que, após o crescimento de 2 a 5 dias num meio de cultura otimizado na gama de temperatura 25-30 °C, as células são colhidas por centrifugação e a biomassa obtida é guardada a aproximadamente 10 °C durante um período de 12 a 48 h. Este armazenamento das células a temperatura mais baixa resulta num aumento do teor de PUFAs entre 0,5 e 5 vezes.

Também a microalga fotoautotrófica *Isochrysis* sp. (TISO) responde às baixas temperaturas de crescimento diminuindo a produção de ácidos gordos saturados e mono-insaturados e aumentando a produção de PUFAs pelo que, globalmente, a razão ácidos gordos insaturados/ácidos gordos saturados aumenta com a diminuição da temperatura (Renaud et al., 1995).

De acordo com Tanaka et al. (2007) *Ulkenia* sp. cresce numa gama de temperaturas de 10 e 35 °C, preferivelmente entre os 17 e os 30 °C. Kumar et al. (2002) também cultivaram *Ulkenia radiata* a temperaturas de 25 a 30°C.

2.5.3.4 pH

O valor do pH de cultura afecta as funções da membrana celular, a estrutura e a morfologia da célula, o consumo de nutrientes e a biossíntese de produtos por microrganismos (Kim et al., 2005; Zhu et al., 2008).

A influência do pH na actividade celular é determinada pela sensibilidade individual das enzimas a alterações do pH (Nielsen, 2003a). Sendo a actividade enzimática global da célula microbiana uma função complexa do valor do pH do meio, o mesmo se pode afirmar relativamente à dependência entre a taxa específica de crescimento e o pH (Fonseca, 2007). Normalmente existe uma gama de uma a duas unidades de pH dentro do qual o valor da taxa específica máxima de crescimento varia pouco (Fonseca, 2007).

Tuttle & Loeblich (1975) determinaram que o pH óptimo para crescimento de *C. cohnii* era 6,6, na gama testada (5,2-7,0). No entanto, o cultivo da microalga pode efectuar-se numa gama mais alargada de valores de pH, entre 5 e 9, de preferência entre 6 e 7 (Kyle et al., 1991; 1998). Uma base como KOH ou NaOH é geralmente utilizada para ajustar o pH do meio antes da inoculação. À medida que a fermentação decorre o pH do meio de cultura torna-se alcalino pelo que pode utilizar-se um ácido inorgânico para corrigir o pH (Kyle et al., 1991; 1998; Kyle, 2004). Contudo, espécies capazes de crescer a pH baixo (≤ 5), onde o crescimento da maior parte das bactérias é inibido, são desejáveis (Behrens et al., 2005).

Jiang & Chen (2000a) estudaram o efeito do pH inicial do meio de cultura (4-10) no crescimento e produção de DHA por *C. cohnii* e obtiveram a taxa específica de crescimento mais elevada ($0,086 \text{ h}^{-1}$), a maior concentração de biomassa ($2,73 \text{ gL}^{-1}$), o rendimento biomassa/glucose mais elevado ($Y_{X/S} = 0,564 \text{ gg}^{-1}$) e a maior percentagem de DHA, em relação ao total de ácidos gordos a pH 7,2.

Schizochytrium e *Traustochytrium* crescem numa gama de pH de 5-11, de preferência entre 6 e 8,5 (Barclay, 1994).

Recentemente, Zhu et al. (2008) obtiveram uma concentração máxima de biomassa ($14,99 \text{ gL}^{-1}$) em culturas de *Schizochytrium limacinum* crescidas com um pH inicial de 4,0 embora a concentração máxima em DHA ($1,77 \text{ gL}^{-1}$) tenha sido obtida para as células crescidas a pH 7,0. Para valores iniciais de pH de 3,0, 9,0 e 10,0 os autores observaram uma inibição significativa do crescimento. Anteriormente, Nakahara et al. (1996) descreveram o valor de pH 4,0 como óptimo para a produção de DHA por

Schizochytrium SR21, enquanto Wu et al. (2005) obtiveram valores máximos para a concentração de biomassa e DHA para pH 7,0. Estas diferenças entre os resultados apresentados, podem ser atribuídas ao facto das estirpes e da composição do meio de cultura serem diferentes (Zhu et al., 2008).

Ganuza et al. (2008) descreveram o crescimento de *Schizochytrium* sp. G13/2S num sistema pH-auxostat em que o NH_4OH era adicionado para controlar o valor de pH em 7. Utilizando esta estratégia *Schizochytrium* sp. cresceu sem limitações de azoto e atingiu uma concentração de biomassa de aproximadamente 60 gL^{-1} em dois dias; produziu quantidades apreciáveis de lípidos (25%) e de DHA (aproximadamente 40% do total dos ácidos gordos). Nesta fase, a produção de PUFAs ocorreu em células em crescimento balanceado e não foi induzida por uma limitação de azoto no meio. Numa segunda fase, a acumulação de lípidos podia ser induzida impondo uma limitação de azoto.

Para *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 o rendimento em DHA e o teor de DHA na biomassa foram máximos para pH inicial de 6,0 (Bajpai et al., 1991b). Contudo, Komazawa et al. (2008) referiram que o DHA, nos triacilgliceróis de *Thaustochytrium* LFF1, aumentava para aproximadamente 80% quando o pH da cultura era 8,5 e que, nestas condições, a concentração em DHA era $0,8 \text{ gL}^{-1}$.

O pH inicial do meio de cultura de *Ulkenia* deve ser ajustado na gama 3,0 a 8,0, preferencialmente entre 3,5 e 4,5 (Tanaka et al., 2007).

2.5.3.5 Salinidade

As células estão separadas do ambiente exterior por uma membrana semi-permeável que, de uma forma geral, é permeável à água e impermeável aos solutos. O stress provocado por um aumento de salinidade no meio de crescimento impõe que se estabeleça um equilíbrio osmótico essencial aos processos físicos e químicos (Richmond, 1986).

O efeito da salinidade no crescimento e no teor de DHA de três estirpes de *C.cohnii* (ATCC 30556, ATCC 50051 e RJH) foi estudado por Jiang & Chen (1999) crescendo as microalgas numa gama de concentrações de NaCl de 0 a 35 gL^{-1} . Obtiveram um teor de DHA superior (56,9 % do total de ácidos gordos) e uma taxa

específica de crescimento superior ($0,090 \text{ h}^{-1}$) e uma maior concentração em biomassa ($2,51 \text{ gL}^{-1}$) para *C. cohnii* ATCC 30556 a crescer com 9 gL^{-1} de NaCl. *C. cohnii* ATCC 50051 e RJH apresentaram uma taxa específica de crescimento máxima e um teor de DHA mais elevado com 5 gL^{-1} de NaCl. Os autores verificaram ainda que, embora o teor de ácidos gordos não apresentasse uma relação óbvia com a salinidade, diminuía para salinidades mais elevadas.

Embora a concentração óptima de NaCl para o crescimento seja específica de cada espécie (Jiang & Chen, 1999) de Swaaf et al. (1999) concluíram que uma concentração mínima de sal do mar de $17,8 \text{ gL}^{-1}$ (aproximadamente metade da salinidade da água do mar) era necessária para crescimento e acumulação de lípidos por *C. cohnii* ATCC 30772. Apesar de *C. cohnii* ser um microorganismo marinho, Kyle et al. (1991) referiram algum crescimento para salinidade zero.

A inibição do crescimento para baixas concentrações de NaCl (3 gL^{-1}) e para concentrações elevadas (50 gL^{-1}) foi descrita para culturas de *C. cohnii* Seligo em frasco agitado (Beach & Holz, 1973) e estáticas (Tuttle & Loeblich, 1975). As microalgas marinhas requerem geralmente uma certa quantidade de ião cloreto, de preferência na forma de cloreto de sódio, para manter o crescimento e a produção de lípidos em cultura (Behrens et al., 2005). A sobrevivência em condições de elevada salinidade requer energia adicional para a síntese de agentes osmoreguladores que permitam manter o equilíbrio iónico entre o meio e o citoplasma e para a reparação de danos provocados pelo excesso de sal (Richmond, 1986).

Atendendo à concentração de cloreto na água do mar ($19,35 \text{ gL}^{-1}$) (Behrens et al., 2005) e a que a maioria dos meios de cultura baseados em água do mar (natural ou artificial) é responsável pela corrosão dos fermentadores de aço inoxidável, espécies de salinidade mais baixa e/ou meios de cultura com menor salinidade são os mais indicados para evitar problemas de corrosão (de Swaaf et al., 1999).

As concentrações de ião cloreto nos meios de cultura utilizados em fermentadores de aço inoxidável devem ser inferiores a $0,3 \text{ gL}^{-1}$ (Barclay et al., 2005; Behrens et al., 2005) para minimizar a corrosão, a ruptura por *stress* (Barclay et al., 2005) e problemas associados a efluentes com elevada salinidade (Barclay, 1994).

Behrens et al. (2005) identificaram e registaram em patente as condições que permitem o crescimento de *Cryptocodinium* em meios de cultura contendo baixas

concentrações de cloreto sem que a biomassa obtida e os teores em lípidos e em DHA sejam afectados negativamente. Para tal os autores manipularam as concentrações dos iões sódio e potássio no meio de cultura.

Yokochi et al. (1998) concluíram que *Schizochytrium limacinum* SR21 tolera uma vasta gama de salinidades, incluindo meios de salinidade zero, observando-se apenas pequenas variações no crescimento na gama de 50-200% da salinidade da água do mar.

Leaño et al. (2003) descreveram como salinidade óptima para crescimento 15-30 ‰ para *Schizochytrium mangrovei*, 15-30 ‰ para *Schizochytrium* sp. e 22-30 ‰ para *Thraustochytrium* sp.. Para a produção de lípidos, a salinidade óptima foi de 15-22,5‰ para *Schizochytrium mangrovei* e de 15‰ para *Schizochytrium* sp. e *Thraustochytrium* sp. Em condições de cultura optimizadas, o DHA correspondia a 33% e 23 % do total de ácidos gordos para os géneros *Schizochytrium* *Thraustochytrium*, respectivamente.

Barclay (1994) descreveu o crescimento de *Schizochytrium* sp. S31 em meios de baixa salinidade mantendo elevados rendimentos em biomassa e em ácidos gordos ω -3. De acordo com este autor, o teor em cloreto nos meios de cultura de *Thraustochytrium* e *Schizochytrium* pode ser reduzido para evitar o seu efeito corrosivo no equipamento de fermentação. A substituição do cloreto de sódio por outros sais de sódio, nomeadamente por sulfato de sódio, além de evitar problemas de corrosão limita o tamanho dos agregados celulares (<150 μ m diâmetro) e torna a biomassa obtida por este processo mais adequada à alimentação de larvas de camarão.

Recentemente, Burja et al. (2006), num *screening* de estirpes de *Thraustochytrium* com vista à produção de ácidos gordos ω -3 destacaram a estirpe *Thraustochytrium* sp. ONC-T18 como capaz de crescer em meios de cultura com baixa concentração de sal do mar (2 gL⁻¹).

Kang et al. (2007) estudaram os efeitos do NaCl e do MgSO₄, principais componentes do sal do mar, na produção de PUFAs por *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 tendo concluído que a redução da concentração de NaCl no meio de cultura favorece a formação de PUFAs e de DHA; o mesmo acontecendo com o MgSO₄. As percentagens relativas de PUFAs e de DHA, em relação ao total de ácidos gordos, são máximas (67,10% e 49,47%, respectivamente) para a concentração de NaCl de 10 gL⁻¹ e de MgSO₄ de 0 gL⁻¹.

Rusing & Luy (2007) patentaram um método de cultivo de microrganismos, em particular dos géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* e *Ulkenia*, num meio de cultura em que a concentração total de sal era inferior a $3,5 \text{ gL}^{-1}$ (inferior a 10% da concentração típica na água do mar) onde o teor em DHA na biomassa era mais de 10% superior ao da biomassa obtida num meio de cultura contendo um teor de sal de 50% do da água do mar. Nesta situação, o processamento do produto era simplificado pelo facto de estar mais concentrado e menos contaminado com sais.

2.5.3.6 Idade da cultura

A fase de crescimento afecta o teor e a composição em ácidos gordos (Jiang & Chen 2000b).

As microalgas oleaginosas tendem a acumular a sua fonte de energia na forma de lípidos à medida que a idade da cultura aumenta (Yongmanitchai & Ward, 1989; Wen & Chen, 2005). Assim, o teor das células em ácidos gordos poli-insaturados tende a seguir uma sigmóide; o teor aumenta até atingir um máximo (geralmente no final da fase logarítmica ou no início da fase estacionária de crescimento) e, depois, decresce gradualmente no final da fase estacionária e na fase de morte (Yongmanitchay & Ward, 1989).

Vazhappilly (1999) ao estudar as principais classes de lípidos envolvidas nas alterações do teor em DHA de duas estirpes seleccionadas em diferentes fases de crescimento confirmou que as alterações na proporção e no teor de DHA se deviam ao efeito da idade das culturas na composição dos triacilgliceróis, os quais constituem a principal classe de lípidos a considerar tendo em vista a produção de DHA.

Harrington & Holz (1968) descreveram um aumento dos teores de 12:0 e 14:0 e um decréscimo do teor de 22:6 em *Cryptocodinium cohnii* com o aumento da idade da cultura na altura da colheita.

Jiang & Chen (2000b) descrevem um aumento do teor em DHA nas células de *C. cohnii* ATCC 30556 até ao início da fase estacionária e uma diminuição do teor de ácidos gordos saturados no final da fase exponencial e no início da fase estacionária. Segundo os autores, estas alterações qualitativas e quantitativas podiam resultar do consumo completo ou limitação por um nutriente específico do meio de cultura. Assim,

torna-se difícil separar o efeito da idade das culturas nos lípidos microbianos do efeito da deficiência de nutrientes nesses mesmos lípidos.

Para *Thaustochytrium aureum* ATCC 34304 o teor de DHA nos lípidos permanece relativamente constante, observando-se o óptimo para 6 dias de cultivo em frasco agitado (Bajpai et al., 1991b). Em fermentador, os autores não observaram, para esta espécie, uma fase pós-exponencial de acumulação de lípidos como é referido para outros microrganismos oleaginosos.

Chen & Chen (1999) consideraram que o tempo de incubação era o factor que mais influenciava a produção de DHA por *Schizochytrium* ATCC 20889, tendo registado um aumento significativo do teor de DHA na biomassa do 5º para o 7º dia de cultivo.

Ao estudarem a produção de DHA por *Isochrysis galbana*, Poisson & Ergon (2001) verificaram que a produtividade volumétrica de DHA não aumentava significativamente do 4º ao 8º dia e, como tal, para aumentar a produtividade as células deveriam ser colhidas no final da fase exponencial, aos 4 dias. No entanto, Liu & Lin (2001) referiram um aumento do teor de DHA até ao oitavo dia de cultura.

2.5.3.7 Intensidade de luz e duração do fotoperíodo

A luz afecta o crescimento e o metabolismo celular assim como a composição em ácidos gordos de microrganismos, sobretudo em espécies fotossintéticas, já que as membranas dos cloroplastos são constituídas por lípidos polares muito insaturados (Wen & Chen, 2001b).

A luz estimula o crescimento dos thraustochytrids heterotróficos. O teor de lípidos na biomassa e a concentração de DHA aumentaram significativamente (42% e 47%, respectivamente) nas culturas de *Thraustochytrium aureum* crescidas à luz comparativamente às culturas crescidas no escuro (Bajpai et al., 1991 b).

De acordo com Tuttle & Loeblich (1975) a presença de luz induz a produção de carotenóides em *C. cohnii* (as células crescidas sob luz fluorescente de $17,9 \text{ Wm}^{-2}$ possuem 4,2 vezes mais carotenóides que as crescidas no escuro) e este facto pode justificar as taxas de crescimento mais baixas obtidas em culturas crescidas na presença de luz.

O óptimo de produção de DHA por *Isochrysis* sp. CCMP 1324 foi obtido com iluminação contínua de 10 klux (Liu & Lin, 2001).

2.5.3.8 Técnicas de cultivo

A produção de produtos de elevado valor acrescentado como o DHA pode ser aumentada em culturas de elevadas densidades celulares, particularmente apropriadas ao cultivo heterotrófico de microalgas (Chen, 1996).

O modo de crescimento em *fed-batch*, frequentemente utilizado em fermentações microbianas, conduz à obtenção de elevadas densidades celulares porque permite contornar a inibição pelo substrato, mantendo a sua concentração no meio abaixo do valor de inibição (Wen et al., 2002).

Ganuza & Izquierdo (2007) estudaram a acumulação de lípidos e de DHA por *Schizochytrium* G13/2S em cultura *batch* e em cultura contínua. Em *batch*, com 40 gL⁻¹ de glucose e 2 gL⁻¹ de glutamato, a produção de lípidos expressa em termos do total de ácidos gordos, aumentou durante o final da fase exponencial, atingiu cerca de 35% da concentração em biomassa e manteve-se constante até que a glucose fosse completamente consumida. Na fase estacionária, o DHA representava 43-47% do total de ácidos gordos. Em cultura contínua, verificou-se que a concentração de biomassa e a produção de ácidos gordos aumentou com a concentração de glucose até 14 gL⁻¹ sem que a proporção entre os diferentes ácidos gordos fosse alterada. Os autores estudaram também a variação da concentração em biomassa e em ácidos gordos com a taxa de diluição tendo verificado que a concentração de biomassa mais elevada (7,7- 6,2 gL⁻¹) e a acumulação máxima de lípidos (31-28% do total de ácidos gordos) eram obtidas para as taxas de diluição mais baixas (0,02 e 0,04 h⁻¹) sendo a produtividade volumétrica máxima em DHA (39 mgL⁻¹h⁻¹) para a taxa de diluição de 0,04 h⁻¹.

Comparando as produtividades volumétricas em DHA obtidas em *batch* (50-46 mg DHA L⁻¹h⁻¹) e em contínuo (39 mg DHA L⁻¹h⁻¹) Ganuza & Izquierdo (2007) concluíram que, apesar da produtividade em *batch* parecer superior, se ela for recalculada atendendo a um período de 24 h necessário para arrancar uma nova fermentação, obtém-se um valor de 32 DHA L⁻¹h⁻¹, inferior ao obtido na cultura contínua. Uma produtividade superior, aliada a um método de colheita mais eficiente (por exemplo, centrifugação em contínuo) e um rendimento biomassa/glucose similar à

cultura *batch*, fazem da cultura contínua de *Schizochytrium* uma técnica de cultivo com potencial para aplicação industrial (Ganuza & Izquierdo 2007).

2.5.4 Estabilização

A oxidação de lípidos pode afectar negativamente o valor nutricional, as qualidades sensoriais e o prazo de validade dos alimentos (Bartee et al., 2007).

Os grupos metileno não conjugados presentes nos ácidos gordos poli-insaturados podem ser facilmente atacados pelo oxigénio formando hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas (Robles Medina et al., 1998). A susceptibilidade de um óleo à oxidação aumenta com a sua insaturação. A velocidade relativa de oxidação para os ácidos esteárico, oleico, linoleico e linolénico é de 1, 100, 1200 e 2500, respectivamente enquanto que, para os ácidos araquidónico, docosapentaenóico e docosahexaenóico a velocidade relativa de oxidação, estimada com base no número de grupos metileno interrompidos por ligações duplas, é de 3600, 4800 e 6000, respectivamente (Bartee et al., 2007).

Uma vez iniciada, a oxidação dos PUFAs prossegue através de uma série de reacções auto-catalíticas que originam uma grande variedade de compostos, muitas vezes pouco conhecidos, que incluem aldeídos, ácidos e outros compostos de baixo peso molecular (Robles Medina et al., 1998). A oxidação é acelerada pela luz, pelo calor, pela humidade, pela presença de oxigénio e de catalisadores tais como iões metálicos. Assim, a exposição dos PUFAs a estes agentes deve ser minimizada durante todo o processamento utilizando atmosfera inerte (azoto ou árgon) se possível. Devem ser evitadas técnicas de separação que empreguem calor e, se estiverem presentes iões metálicos (tais como o cobre) estes devem se inactivados por formação de complexos com EDTA (Robles Medina et al., 1998).

Para evitar ou limitar a oxidação dos lípidos, recorre-se, frequentemente, a antioxidantes os quais apresentam a capacidade de retardar ou prevenir a oxidação, mesmo em concentrações muito baixas em comparação com a do substrato. Os antioxidantes são, usualmente, classificados em primários e secundários, tendo em conta o modo como interagem com o substrato oxidável. Assim, os antioxidantes primários ou de tipo 1 atrasam ou inibem o passo de iniciação ou interrompem o de propagação da auto-oxidação. Em geral, reagem com os radicais convertendo-os em produtos

termodinamicamente mais estáveis. Todavia, estes antioxidantes podem tornar-se pró-oxidantes se estiverem presentes em grandes concentrações. De entre os antioxidantes primários destacam-se os tocoferóis, o ácido ascórbico, o hidroxianisol butilado (*Butylated Hydroxyanisole* – BHA) e o di-*ter*-butilhidroxitolueno (*Butylated Hydroxytoluene* – BHT), em que os dois últimos são sintéticos (Faria & Batista, 2007).

Os antioxidantes secundários, preventivos ou de tipo 2, actuam através de vários mecanismos que incluem: (i) decomposição dos hidroperóxidos em compostos inactivos, como é o caso de vários tióis e sulfitos; (ii) diminuição da sensibilidade dos sistemas com duplas ligações para formar radicais livres, como a estabilização do ácido linoleico pelo hidróxido de potássio; (iii) prevenção da iniciação por acção da luz ou de outra radiação, tais como carotenos que neutralizam o efeito de fotosensibilização da clorofila; (iv) desactivação de metais pesados, tal como agentes quelantes de que são exemplos os ácidos cítrico, fosfórico e fumárico (Faria & Batista, 2007). Estes antioxidantes apresentam, em geral, sinergia com os antioxidantes primários, sendo utilizados em conjunto (Zuta et al., 2007).

Como a auto-oxidação é proporcional à concentração de oxigénio para baixas pressões, há que evitar a sua presença; as amostras devem ser seladas sob vácuo em ampolas com o mínimo de espaço vazio (Robles Medina et al., 1998). O armazenamento a baixa temperatura é essencial. A -20°C a taxa de degradação é 1/16 da que ocorre à temperatura ambiente. O armazenamento durante períodos longos (vários anos) requer temperaturas de -40 a -80 °C (Robles Medina et al., 1998).

A butil hidroquinona terciária (*Tertiary Butylhydroquinone* – TBHQ), o BHT e o octilgalato em concentrações de 0,01-0,02% são anti-oxidantes efectivos para PUFA's (Robles Medina et al., 1998). No entanto, as preferências dos consumidores vão no sentido da utilização de “produtos naturais” nos alimentos, por exemplo ácido ascórbico ou α -tocoferol. A adição de antioxidantes sintéticos como o BHT, o BHA e o TBHQ a produtos alimentares, apesar de considerada segura, tornou-se uma questão delicada em termos de *marketing* (Zuta et al., 2007).

De acordo com Bartee e colaboradores (2007) é possível aumentar a estabilidade dos óleos contendo AA, DPA e DHA adicionado uma combinação de ascorbil-palmitato e tocoferol calculada utilizando o método de análise de superfície de resposta.

A qualidade dos óleos, ricos em DHA produzidos por microrganismos, é rigorosamente garantida durante a produção e processamento e mantida no produto final pela adição de anti-oxidantes (250 ppm de ascorbil palmitato e 250 ppm de tocóferóis,

no caso do DHASCO) e pelo armazenamento do óleo a temperaturas baixas, em recipientes embalados sob atmosfera de azoto (Wynn et al., 2005).

2.5.5 Mercado

O mercado dos PUFAs ω -3 encontra-se em franca expansão e abrange sectores como a alimentação infantil, os produtos dietéticos, os alimentos enriquecidos, a alimentação animal (galinhas, vacas, porcos) (Molina Grima, 1996) e a aquacultura (Barclay & Zeller, 1996).

O óleo rico em DHA (DHASCO), produzido pelo processo Martek, destina-se exclusivamente ao mercado das formulações infantis. Este óleo é misturado, numa razão 1:2 (v/v) com ARASCO™ e vendido sob o nome Formulaid (Ratlidge, 2004). A produção de Formulaid foi de aproximadamente 700 ton em 2003 (240 ton DHASCO), aproximadamente 1000 ton em 2004 e estima-se que em 2010 atinja as 4000 ton/ano (Kyle, 2005). O DHASCO é, actualmente vendido a 150 €/kg (Wynn *et al.*, 2005) sendo, portanto, muito mais caro que os óleos de origem vegetal e animal cuja cotação se encontra no intervalo 0,3-0,6 €/Kg.

O sucesso comercial do óleo enriquecido em DHA e AA pode ser atribuído a três factores principais:

- ao conhecimento acumulado em tentativas anteriores de *scale-up* de processos para a obtenção de outros óleos a partir de microrganismos;
- à necessidade de um óleo com características específicas para a indústria de alimentos para bebé;
- à falta de alternativas de origem animal ou vegetal com essas características específicas (Kyle, 2005).

Os resultados favoráveis dos testes de toxicologia realizados em várias espécies animais permitiram à *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos da América (Food and Drug Administration, 2001) e a outras autoridades noutros países, reconhecerem como seguros, GRAS, os óleos de origem microbiana e permitir a sua utilização em alimentos para bebés.

Pelo processo Omega-Tech a Martek obtém um óleo com um teor em DHA superior a 40% (m/m) designado DHASCO-S ou “S-type DHA”. Este óleo, vendido a 0,9 €/Kg, destina-se a competir com o óleo de peixe no sector dos suplementos

alimentares para adultos e é sobretudo vendido na forma de cápsulas (Kyle, 2005, Barclay et al., 2005) e incorporado em alimentos tais como queijos, iogurtes e cereais de pequeno almoço bem como em bebidas (Spolaore et al., 2006). Em 2003 a produção de DHASCO-S foi de 10 ton e estima-se que a produção de SCO aumente 2000 ton/ano até 2010 atendendo apenas a novas aplicações alimentares (iogurtes, bebidas, sopas, barras alimentares, pão, formulações em pó, etc.) isto é, excluindo os mercados das formulações infantis e da alimentação animal (Kyle, 2005).

A produção de óleo rico em DHA utilizando *Ulkenia sp.* no Japão e na Alemanha é recente (Ratledge, 2005). Este óleo tem sido testado em produtos de padaria, cereais, produtos lácteos, iogurtes, sumos de fruta e “snacks” (Kiy et al., 2005).

As elevadas concentrações em DHA dos óleos obtidos a partir de *Ulkenia sp.* permitem produzir cápsulas muito mais pequenas que as de óleo de peixe, com a mesma quantidade de DHA e sem o sabor a peixe (Kiy et al., 2005).

Para além das previsões de crescimento do mercado no que se refere às aplicações actuais do DHA (alimentação infantil e suplementos nutricionais) há que considerar todo um conjunto de novas aplicações potenciais deste ácido gordo, nomeadamente no sector da alimentação animal e da aquacultura em particular.

Existem actualmente alguns exemplos de aplicação de ácidos gordos na alimentação animal. Têm sido utilizados óleos de peixe e óleos vegetais para suplementar a ração de galinhas poedeiras e obter ovos ricos em DHA (Farrel, 1998; Horrocks & Yeo, 1999). No entanto, esta suplementação apresenta algumas desvantagens: o ácido α -linolénico, presente nos óleos vegetais, tem de ser convertido a DHA e o processo de conversão é limitado em muitos animais; o óleo de peixe apresenta problemas de estabilidade quando é adicionado às rações já que a elevada área superficial das mesmas facilita a oxidação dos ácidos gordos e isso traduz-se no sabor e no odor (Barclay et al., 1998). Reconhecendo estes problemas, e atendendo a que as algas são os produtores primários de EPA e DHA tem sido testada a utilização de biomassa microbiana na alimentação animal. Foi utilizada biomassa de *Schizochytrium* na alimentação de galinhas poedeiras e de vacas leiteiras para produzir ovos e leite enriquecidos em DHA (Franklin et al. 1999). Foram registados em patente métodos de incorporar PUFAs (de origem microbiana) no leite (Abril et al., 2008). A biomassa *Schizochytrium* tem sido utilizada na aquacultura para enriquecer rotíferos e larvas de *Artemia* em DHA, antes dos mesmos serem utilizados na alimentação de larvas de peixe e de camarão (Barclay & Zeller, 1996). Hayashi et al. (2007) verificaram que a

alimentação de rotíferos com thraustochytrids enriquecidos em vitamina B12 aumenta significativamente a taxa de crescimento dos mesmos. A biomassa de *Schizochytrium* e *Crypthecodinium* é, actualmente, comercializada para alimentação de larvas de peixe e de camarão (Aquafauna Bio-Marine, 2008).

Prevê-se que a aquacultura venha a consumir 1133000 ton de óleo de peixe em 2010 o que, dependendo da produção, poderá corresponder a cerca de 80% da produção de óleo de peixe (Bergé & Barnathan, 2005).

Por um lado, a falta de sustentabilidade do recurso e, por outro, a bioacumulação de toxinas são argumentos de peso a favor da substituição dos alimentos à base de peixe e óleo de peixe na aquacultura e fazem com que este sector constitua uma oportunidade de mercado única para o DHA e para a biomassa rica em SCO (Kyle, 2005).

Segundo Kyle (2005), a substituição das fontes tradicionais de PUFAs (óleo/farinha de peixe) por biomassa SCO constitui uma alternativa “Clean & Green” aceite pela maioria dos consumidores, que considera dispostos a pagar um acréscimo de 15% no custo do produto final, sobretudo se for dado algum incentivo governamental no sentido da utilização de fontes sustentáveis de ácidos gordos poli-insaturados.

2.6 *Crypthecodinium cohnii*

2.6.1 Taxonomia

A designação “dinoflagelados” deriva da palavra grega *dinos* (rotação em espiral), associada ao movimento característico destes organismos, e do latim *flagellum* (flagelo). O primeiro dinoflagelado foi descrito por Baker em 1753 e classificado por Muller em 1773.

A classificação dos dinoflagelados em geral e de *Crypthecodinium cohnii* em particular, é muito controversa. Os dinoflagelados são eucariontes unicelulares primitivos e os principais constituintes do fitoplâncton (Barbier et al., 1995; Hackett et al., 2004) marinho e de água doce (Sanchez-Puerta et al., 2007). São organismos peculiares porque, apesar de serem eucariontes, mantiveram algumas características procariotas, e possuem também algumas características próprias tais como membrana nuclear permanente, cromossomas condensados ao longo de todo o ciclo de vida.



ausência de histonas e nucleossomas (Moreau et al., 1998; Soyer-Gobillard et al., 1999). O fuso mitótico é extranuclear e penetra o núcleo através de canais citoplasmáticos (Perret et al., 1993; Bhaud et al., 2000).

Tradicionalmente, os zoólogos classificavam os dinoflagelados como protozoários enquanto que os botânicos os consideravam algas. Os dinoflagelados foram descritos pela primeira vez por Otto Bütschli em 1885. Actualmente, os dinoflagelados são classificados como Alveolates: protistas unicelulares que não são nem animais nem plantas (Clowes, 2003). Aproximadamente metade das espécies de dinoflagelados são fotossintéticas, outras são heterotróficas e, algumas possuem as duas formas de nutrição, facto que evidencia a inutilidade das tentativas de classificação destes organismos relativamente simples em algas e animais (Fensome et al.).

Cryptocodinium cohnii foi descrita por Seligo (1885) como *Glenodinium cohnii*. Seligo estudou a morfologia destas células e referiu a presença do sulco transversal característico das mesmas, o qual está muito deslocado e não rodeia completamente a célula. Schiller (1933) transferiu este organismo para o género *Gyrodinium* Kofoid & Swezy (1921) como *Gyrodinium cohnii* (Seligo) Schiller. Biecheler (1952) descreveu um novo género, com uma única espécie, *Cryptocodinium setense* Biecheler, caracterizado pela presença de finas tecas cuja visualização necessitava de um método de fixação especial. A morfologia destas células era muito semelhante às de *Gyrodinium cohnii* e Chatton (1952) considerou-as co-específicas e introduziu a combinação *Cryptocodinium cohnii* (Seligo) Chatton. Desde então, vários flagelados morfologicamente semelhantes têm sido isolados e considerados *Cryptocodinium cohnii* (Ucko et al., 1997).

Ucko et al. (1989, 1994, 1997) descreveu como semelhante a *C. cohnii* um dinoflagelado heterotrófico encontrado numa cultura exterior de *Porphyridium* sp., uma alga vermelha unicelular, em Elat, Israel. Parrow et al. (2006) descreveu um dinoflagelado, presente na água salobra de um aquário na Universidade Estatal da Carolina do Norte, E.U.A., muito semelhante ao descrita por Ucko et al., (1997) e que encaixava na descrição de *C. setense* de Biecheler. Este estudo demonstrou de forma clara a tabulação das espécies *Cryptocodinium* por microscopia electrónica de varrimento.

Cryptocodinium cohnii é considerada uma espécie complexa, constituída por muitas “espécies semelhantes” (Beam & Himes, 1982; Beam & Himes, 1987). Isto significa que nem todos os membros da espécie taxonómica são membros da mesma

espécie biológica e portanto, não partilham o mesmo fundo genético. De alguma forma subdividiram-se em “espécies semelhantes” isto é, reprodutivamente isoladas mas morfologicamente semelhantes (Beam & Himes, 1987).

2.6.2 Morfologia

Crypthecodinium cohnii apresenta duas morfologias: células nadadoras e quistos (Bhaud et al., 1991) de dimensões muito variáveis. As células nadadoras apresentam valores de velocidade na ordem de 1km/ano (Beam & Himes, 1982).

Tal como noutros dinoflagelados, as células nadadoras possuem dois flagelos heteromórficos e heterodinâmicos distintos: um transversal, em forma de fita, cujo batimento faz com que o organismo gire sobre si mesmo, promovendo a sua estabilização e propulsionando-o para a frente; e um longitudinal, orientado perpendicularmente em relação ao primeiro, que determina a direcção do movimento (Hackett et al., 2004). Os dois flagelos inserem-se na mesma zona da célula, o que define, por convenção, a superfície ventral (Fensome et al.; Clowes, 2003). Por oposição fica definida a superfície dorsal; os lados direito e esquerdo da célula definem-se por convenção biológica tal como nos humanos (Clowes, 2003).

Os flagelos encontram-se inseridos em dois sulcos (transversal – *cingulum* e longitudinal – *sulcus*, respectivamente) (Clowes, 2003). Em algumas estirpes de *C. cohnii*, como a Elat, o *cingulum* encontra-se deslocado e rodeia apenas dois terços da célula (Ucko et al., 1997) mas, noutras estirpes, não está deslocado e forma um *loop* completo (Perret, 1993).

A parte da célula (vegetativa ou do quisto) anterior ao *cingulum* chama-se epissoma e a parte posterior denomina-se hipossoma (Perret et al., 1993; Clowes, 2003).

A representação esquemática de *C. cohnii* por Perret et al. (1993) mostra um sulco transversal que dá quase uma volta completa à célula (fig. 15). Esta representação difere, no entanto, da descrição original (Seligo, 1885) na qual o referido sulco está muito deslocado e não rodeia completamente a célula. Parrow et al. (2006) mostraram uma fotografia, obtida por microscopia electrónica, de uma espécie de *Crypthecodinium* na qual o *cingulum* apenas rodeia dois terços da célula (fig.16).

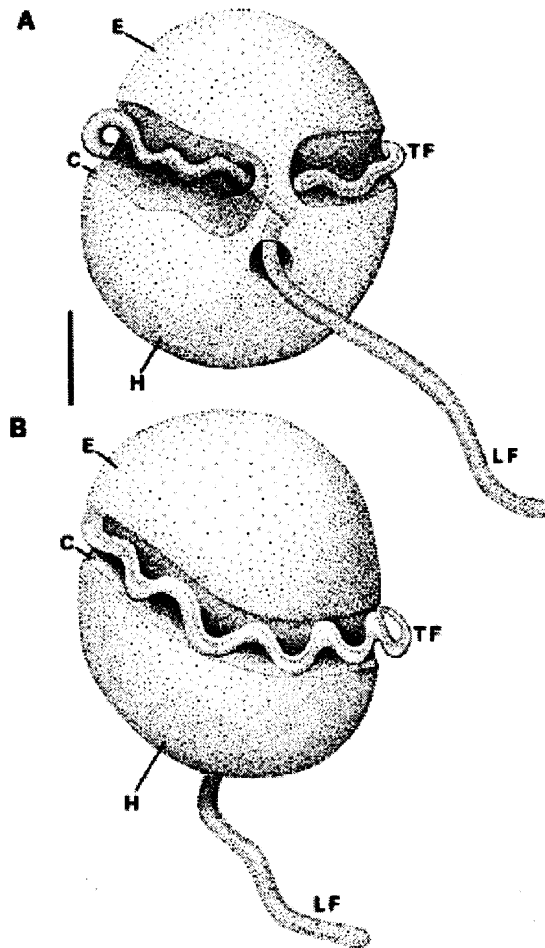


Figura 15 – Representação esquemática de *Crypthecodinium cohnii*. (A) superfície ventral, (B) superfície dorsal. E - epissoma; H - hipossoma, LF - flagelo longitudinal, TV - flagelo transverso. A barra corresponde ao comprimento de 5 μm (Perret et al., 1991).

Crypthecodinium cohnii é uma espécie tecada. Possui uma teca delicada com 15 a 20 μm (Kubai & Ris, 1969) cujas placas, constituídas maioritariamente por celulose (Kwok & Wong, 2003), são pouco visíveis sendo, por vezes, necessário recorrer a um método de coloração especial (Ucko et al., 1997). Durante a locomoção da célula a teca deforma-se (Sournia, 1986). A tabulação (arranjo das placas tecais) (Clowes, 2003) é utilizada como critério taxonómico (Parrow et al., 2006).



Figura 16 – Fotografia de uma espécie de *Crypthecodinium* obtida por microscopia electrónica de varrimento (Parrow et al., 2006).

Os quistos apresentam-se isolados com uma forma ovóide (Sournia, 1986). Ou estão em estado de dormência/sobrevivência ou estão a dividir-se (quistos vegetativos) (Bhaud et al., 1991).

Ratledge et al. (2003) demonstraram que a forma enquistada, não móvel, possui teores superiores de lípidos, nomeadamente DHA, que a forma não enquistada (células nadadoras).

2.6.3 Habitat

A *Crypthecodinium cohnii* e as suas espécies semelhantes são cosmopolitas e foram encontradas em todo o mundo (Moreau e tal., 1998), dispersas nas águas temperadas e tropicais, desde o Atlântico Norte ao mar das Caraíbas (Beam & Himes, 1977). Foram encontradas no Atlântico (Sournia, 1986) e também no Pacífico e Mediterrâneo (Beam & Himes, 1977) e no Índico (Beam & Himes, 1982).

Foram encontradas em vários *habitats* incluindo praias oceânicas abertas, baías salobras poluídas, estuários e portos gelados no Atlântico Norte (Himes & Beam, 1978). Muitas vezes encontram-se associadas a macroalgas, em particular *Fucus* spp. (Beam & Himes, 1982; Ucko et al., 1997). *C. cohnii* e as suas espécies semelhantes foram também isoladas de outro tipo de hospedeiros tais como *Macrocystis*, *Sargassum* (Beam & Himes, 1977), *Cystoseira*, *Zostera*, *Thalassia*, *Phragmites* e *Acetabularia* (Beam & Himes, 1982).

A distribuição geográfica é difícil de interpretar. Apesar das células nadadoras serem móveis, a sua velocidade (1 km.ano^{-1}) não explica a sua distribuição, devendo-se esta a outros agentes de dispersão (Beam & Himes, 1982).

C. cohnii tem uma longa história de cultivo em laboratório que remonta a 1908 (Kyle, 1996) e não há qualquer indicação de que seja tóxica ou patogénica (Kyle, 1996).

2.6.4 Nutrição

Cryptocodinium cohnii é um organismo heterotrófico obrigatório (Ucko et al., 1997; Behrens et al., 2005), não possui cloroplastos (Henderson et al., 1988; Sanchez-Puerta et al., 2007) e, como tal, necessita de uma fonte de carbono e energia para crescer e se multiplicar, podendo fazê-lo no escuro. No seu habitat natural, este e outros nutrientes são obtidos das águas agitadas ou em putrefacção, de onde é normalmente recolhida (Beam & Himes, 1987).

Beam & Himes (1987) sugeriu que *C. cohnii* poderia parasitar plantas aquáticas (macrófitas) atendendo ao facto das células móveis de todas as estirpes da microalga parecerem possuir um pedúnculo, um organelo empregue por outros dinoflagelados em fagotrofia. Existem também algumas estirpes fagotróficas (Ucko et al., 1997), por exemplo a *Elat*, que se alimenta especificamente das células da microalga *Porphyridium* sp. (Ucko et al., 1994; 1997). Nesta estirpe, o mecanismo de obtenção de alimento é a mizocitose (*myzocytosis*) isto é, o conteúdo da célula presa é sugado por um tubo de alimentação (Ucko et al., 1997).

2.6.5 Reprodução

Cryptocodinium cohnii possui duas estratégias de multiplicação – a reprodução assexuada e/ou a reprodução sexuada. A última surge normalmente quando as condições do meio de cultura são desfavoráveis (Tuttle & Loeblich, 1975; Bhaud et al., 1988) e também foi observada em culturas densas, de crescimento rápido (Ucko et al., 1997).

Ciclo vegetativo

Os dinoflagelados são verdadeiros eucariontes com ciclos G_1 -S- G_2 -M mas apresentam características peculiares tais como: elevado conteúdo genómico do DNA, membrana nuclear permanente, fuso mitótico extra-nuclear e cromossomas ligados à membrana nuclear para segregação (Bhaud et al., 2000)

Todos os dinoflagelados, com excepção dos membros da divisão *Syndinea*, possuem um dinocário, isto é, um núcleo caracterizado pelos cromossomas não possuírem histonas nem nucleossomas (Moreau et al., 1998; Bhaud et al., 2000) e permanecerem condensados entre as divisões celulares (Rizzo, 2002). A membrana nuclear de todos os dinoflagelados permanece intacta durante a mitose (mitose fechada) (Barbier et al., 1995; Saldarriaga et al., 2004), sendo, por isso, o fuso mitótico extranuclear (Moreau et al., 1998; Saldarriaga et al., 2004).

Cryptocodinium cohnii apresenta um ciclo celular complexo em que cada célula pode originar quistos que, sofrendo 1,2 ou 3 ciclos de mitose sucessivos, dão origem a 2, 4 ou 8 células (Bhaud et al., 1991), dependendo do caminho no ciclo celular que cada uma das células tomar (Wong & Whiteley, 1996).

Bhaud e colaboradores (1994) estudaram o ciclo celular desta microalga em detalhe (fig. 17).

Na fase G_1 as células de *C. cohnii* são biflageladas e nadadoras (móveis). Quando entram na fase S tornam-se esféricas, perdem os flagelos e enquistam (imóveis) (Kwok & Wong, 2003). Em G_2 e M estão enquistadas (Bhaud et al., 1991; Wong & Whiteley, 1996; Kwok & Wong, 2003). O crescimento ocorre nas fases G_1 e G_2 , sobretudo na fase G_1 (Kwok & Wong, 2003).

Em termos de duração, o primeiro ciclo celular de *Cryptocodinium cohnii* é aproximadamente: fase G_1 6 horas, fase S 1h 30 min, G_2 +M 1 h 30 min com libertação de células vegetativas 1 a 2 h após a citocinese e o segundo ciclo celular é G_1 +S 3 h e G_2 +M 2h (Bhaud et al., 1991).

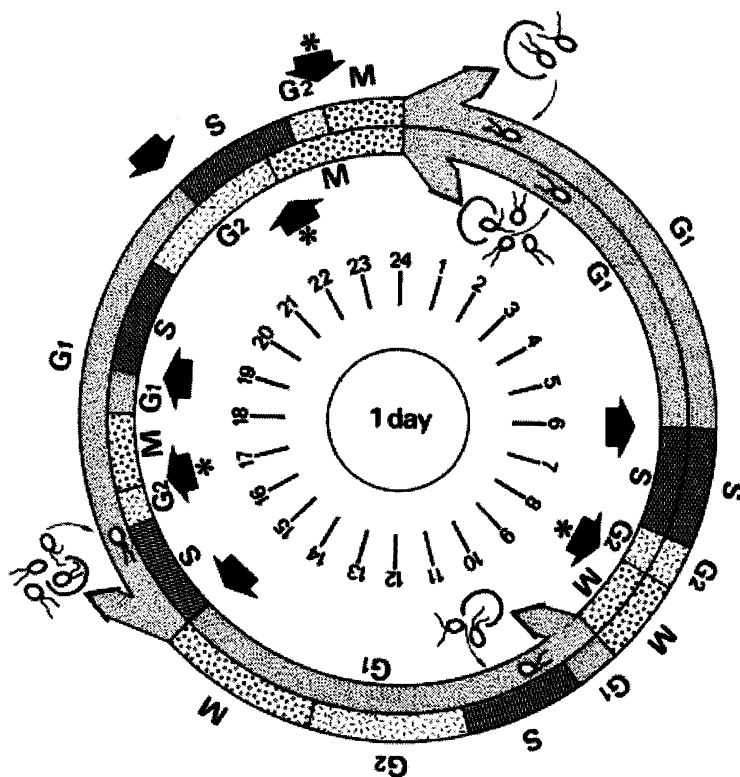


Figura 17 – Diagrama dos ciclos celulares sucessivos de *Crypthecodinium cohnii* ao longo de 24 h. Neste exemplo, uma célula vegetativa dá origem a 4 células que são libertas filhas num ciclo celular de 16 h. Uma dessas novas células nadadoras origina duas células filhas 10 h mais tarde (círculo externo do diagrama). Durante este tempo, outras células nadadoras seguem um percurso diferente (círculo interno). Os pontos de transição G₁/S são representados por setas e os pontos de transição G₂/M por seta e asterisco (Bhaud *et al.*, 1994). São possíveis vários diagramas.

Adicionando um inibidor da síntese proteica, Bhaud e colaboradores (1994) determinaram a extensão da fase G₂ (30 min) no primeiro ciclo (ciclo com fase G₁ nadadora) e a duração das fases do segundo ciclo (ciclo no quisto): fase G₁ (30 min), fase S (1 h e 30 min), fase G₂ (2 h) e fase M (2 h). Antes do fim da fase G₁ do segundo ciclo as células não estão prontas a iniciar uma nova fase S; necessitam de sintetizar proteínas específicas para essa fase pelo que os autores surgem a existência de um ponto de transição G₁/S. Pela mesma razão a fase G₂ do primeiro ciclo (antes de mitose) sugere a existência de um segundo ponto de transição G₂/M à semelhança do que acontece noutros eucariontes (Bhaud *et al.*, 1994).

Reprodução sexuada

O ciclo sexual de *Cryptocodinium cohnii*, à semelhança do que acontece com o de outros dinoflagelados, é difícil de documentar porque: os gametas são idênticos às células vegetativas (Beam et al., 1977; 1978), a fusão dos gametas pode ser confundida com divisão (Parrow, 2003) e a reprodução sexuada é menos frequente que a assexuada (Parrow, 2003).

Em termos de reprodução sexuada *Cryptocodinium cohnii* apresenta iso e anisogamia e forma uma "ponte de fertilização". Durante a fertilização ocorre a fusão dos gametas e forma-se um planozigoto. O número de flagelos desta estrutura não é conhecido (Bhaud et al., 1988). O zigoto enquistado e, no quisto, ocorre ciclose nuclear que é utilizada para distinguir os quistos de origem zigótica dos quistos vegetativos (Ucko et al., 1997).

A meiose de *C. cohnii* é peculiar tal como foi demonstrado por recombinação de mutantes móveis (Beam & Himes, 1974, 1982; Tuttle & Loeblich, 1974a,b; Himes & Beam, 1975, 1978; Beam et al., 1977). Bhaud et al. (1991) descreveram por um lado, meiose convencional com duas divisões e sem *crossing-over* e, por outro, meiose com apenas uma divisão.

Ucko et al. (1997) estudaram a reprodução de *C. cohnii* Elat e descreveram que os gametas (células semelhantes às células vegetativas) formam grupos de 3-8 células que se movem activamente umas à volta das outras até que duas células diferentes (anisogametas) ou iguais (isogametas) estabelecem contacto com as suas faces ventrais e iniciam a fusão; os outros flagelados afastam-se e as células em fusão perdem um flagelo transversal (Ucko et al., 1997); o zigoto formado move-se com dois flagelos longitudinais e, passado algum tempo enquista (Ucko et al., 1997). Os quistos dividem-se e libertam normalmente dois, mas às vezes 4-8 dinoflagelados (Ucko et al., 1997). Os novos dinoflagelados tornam-se móveis quando abandonam o quisto e podem ser células vegetativas ou gametas (Ucko et al., 1997).

2.6.6 Composição e metabolitos

A composição de *C. cohnii* em termos de lípidos é única atendendo a que sintetiza apenas um ácido gordo poli-insaturado em quantidades superiores a 1% do

total de ácidos gordos, o ácido docosahexaenóico, 2:6(n-3) (Harrington & Holz 1968; Beach & Holz, 1973; Van Pelt et al., 1999; de Swaaf et al., 1999).

Henderson et al. (1988) determinaram que os lípidos representavam 24,6 % da biomassa seca de *C.cohnii* WH-d, cultivada em frascos agitados em meio MLH, durante seis dias. Os lípidos eram constituídos maioritariamente por lípidos neutros (71,6 % m/m), dos quais 76,4 % (m/m) eram triacilgliceróis. A fosfatidilcolina era o lípido polar mais abundante (63,6%, m/m) e a fosfatidiletanolamina o segundo mais abundante, embora presente em quantidades muito inferiores ao primeiro (7,5 % m/m). Os ácidos gordos nos triacilgliceróis eram predominantemente saturados, enquanto que 57 % (m/m) dos ácidos gordos na fracção da fosfatidilcolina eram poli-insaturados, representando o DHA mais de 50% dos ácidos gordos desta fracção.

Beach & Holz (1973) também obtiveram 66% de DHA na fracção da fosfatidilcolina, a qual correspondia a 79% dos lípidos polares, e apenas 25 % na fracção dos triacilgliceróis (44% dos lípidos neutros).

Pelo contrário, Wynn et al. (2005) referem que o DHA se acumula predominantemente nos triacilgliceróis das células de *C. cohnii*, isto é, na fracção dos lípidos neutros. De acordo com o processo industrial registado em patente pela Martek Corporation, o óleo extraído da biomassa de *C.cohnii* é constituído por mais de 70% de triacilgliceróis, contendo em geral 30-50% de DHA (Kyle, 2004).

O constituinte principal da parede celular de *C. cohnii* é a celulose à semelhança do que acontece nas células das plantas (Kwok & Wong, 2005).

C. cohnii não possui pigmentos fotossintéticos mas, como reserva, acumula amido e lípidos (Pringsheim, 1956; Loeblich, 1976) e sintetiza β e γ -caroteno (Withers & Tuttle, 1979), 4 α -metil esteróis, dinosterol, dihidrodinosterol (4 α ,23,24-trimetilcolesta-5,22-dien-3 β -ol), 4 α ,24-dimetil-colestan-3 β -ol e 4 α ,24-dimetilcolest-5-en-3 β -ol (Withers et al., 1979).

De Swaaf et al. (2001) caracterizaram os polissacáridos extracelulares produzidos por *C.cohnii* que descreveram como constituídos por 55% de polissacáridos, 10% de componentes proteicos, 10% de material desconhecido (precipitado após hidrólise), 7% de cinzas e quantidades vestigiais de Si, Cl, Fe, Zn e Cu. *C. cohnii* produz vários exo-polissacáridos de tamanho e composição variados. Foram detectadas uma fracção de massa molecular superior (de 100 kDa a >1660 kDa) e uma fracção de massa molecular média (6-48 kDa). A primeira continha, numa base molar, 71,7% de

glucose, 13,1 % de galactose e 3,8 % de manose, enquanto a segunda continha 37,7% de glucose, 19,8 % de galactose e 28,1 % de manose (de Swaaf et al., 2001).

2.7 Produção de DHA por *Cryptocodinium cohnii*

Como já foi referido, os microrganismos *Schizochytrium* sp. e *Ulkenia* sp. são utilizados para a produção industrial de DHA e a sua maior desvantagem reside no facto de produzirem também quantidades significativas de ácido docosapentaenóico 22:5 ω -6 (DPA) (Nakahara et al., 1996; Yokochi *et al.*, 1998; de Swaaf, 2003). Como as propriedades e funções do DPA ainda não estão esclarecidas (Nakahara et al., 1996), a sua presença em óleos microbianos destinados a aplicações alimentares e farmacêuticas deve ser encarada com cautela ou mesmo evitada. Por outro lado, a separação do DPA e DHA é difícil e dispendiosa (de Swaaf, 2003) pela proximidade estrutural e pela semelhança de propriedades físico-químicas. Pelas razões anteriormente apresentadas, o óleo produzido utilizando estes microrganismos destina-se ao mercado dos suplementos alimentares para adultos (Ratledge, 2004) e das rações para aves domésticas e para aquacultura (Sijtsma & Swaaf, 2004).

Comparando o perfil de ácidos gordos dos microrganismos utilizados na produção comercial de DHA e das fontes convencionais (tabela 9) verificamos que *Cryptocodinium cohnii* apresenta um perfil de ácidos gordos pouco complexo (muito menos complexo do que o de óleo de peixe), e não produz nem EPA nem DPA o que a torna indicada para a produção de DHA para incorporação em alimentos para bebés.

Por outro lado, o DHA é o constituinte maioritário dos triacilgliceróis acumulados por *C. cohnii* (Beach & Holz, 1973; Wynn et al., 2005; Sijtsma et al., 2005), a forma preferível para aplicações alimentares (Wynn et al., 2005) e aquela que se encontra no leite materno (Koletzko et al., 2001b).

O *screening* de várias microalgas com vista à produção de DHA indicou a microalga *Cryptocodinium cohnii* como uma fonte promissora deste ácido gordo; a microalga produzia elevadas concentrações de biomassa com um teor elevado de DHA, não produzia EPA e apresentava uma taxa específica de crescimento elevada (Vazhappily & Chen, 1998). Posteriormente, o *screening* entre várias estirpes desta

microalga permitiu seleccionar as estirpes mais adequadas à produção comercial do referido ácido gordo.

Apesar da capacidade de *C. cohnii* para produzir DHA ser conhecida desde o final dos anos sessenta (Harrington et al., 1968; Beach & Holz, 1973; Tuttle & Loeblich, 1975), as estirpes estudadas não eram capazes de crescer em tanques agitados por serem sensíveis à agitação e às elevadas concentrações de oxigénio existentes neste tipo de equipamentos (Wynn et al., 2005).

A empresa Martek, combinando técnicas de *screening* e modificações do meio de cultura, conseguiu otimizar o crescimento de uma estirpe seleccionada de *C. cohnii* e produzir DHA em tanques agitados (Stirred Tank Reactor, *STR*) utilizando glucose como principal fonte de carbono (Kyle, 1996). Conseguiu ainda aumentar o teor em lípidos na biomassa das células da estirpe de produção em 242% entre 1997 e 2002 (Wynn et al., 2005).

A cultura do microrganismo faz-se a partir de uma cultura criopreservada e certificada que é transferida progressivamente para frascos agitados e fermentadores de maior volume, até um volume final de aproximadamente 200 m³, mantendo um volume de inóculo de 5-10% (v/v) (Wynn et al., 2005). A temperatura, pH, arejamento, agitação e o oxigénio dissolvido são continuamente monitorizados e controlados (Wynn et al., 2005).

Atendendo a que a taxa específica de crescimento de *C. cohnii* é muito inferior à das bactérias, o processo é susceptível de contaminação. Assim, a higiene da instalação industrial, a limpeza e a esterilização *in situ* são também aspectos a monitorizar e a manter (Wynn et al., 2005).

O meio de cultura é mantido ao longo de todo o processo de produção de inóculo para o fermentador de produção, para evitar o *stress* do organismo e possui uma concentração em ião cloreto inferior à dos meios de cultura baseados em água do mar, geralmente utilizados em investigação, pelo facto destas concentrações de cloreto não serem compatíveis com os tanques de aço inoxidável (Wynn et al., 2005).

A fermentação, em *fed-batch*, decorre em duas etapas. A primeira de crescimento activo, com células móveis, em que o conteúdo lipídico na biomassa é mínimo (aproximadamente 20 % m/m) e a segunda, em que há esgotamento da fonte de azoto mantendo a alimentação de carbono; nesta fase, o crescimento e a divisão celular param uma vez que não há síntese de nucleótidos e proteínas e o carbono é convertido em lípidos de reserva (TAG) ricos em DHA, os lípidos constituem mais de 50% da

biomassa e as células perdem os flagelos e enquistam (Wynn et al., 2005). A manutenção da concentração de carbono é um aspecto importante da optimização da acumulação dos lípidos: promove a síntese de lípidos e evita a utilização de lípidos de reserva já que a β -oxidação induzida nas células por limitação de carbono provoca um aumento dos ácidos gordos livres e de di/ monoacilgliceróis no extracto final; estes, além de complicarem o processamento final, baixam o rendimento do processo e a estabilidade do óleo obtido (Wynn et al., 2005).

As células são colhidas por centrifugação em contínuo e secas por atomização. A oxidação do óleo intracelular por exposição ao oxigénio é minimizada guardando a biomassa a -20°C sob azoto até à extracção do óleo (fig. 18) (Wynn et al., 2005).

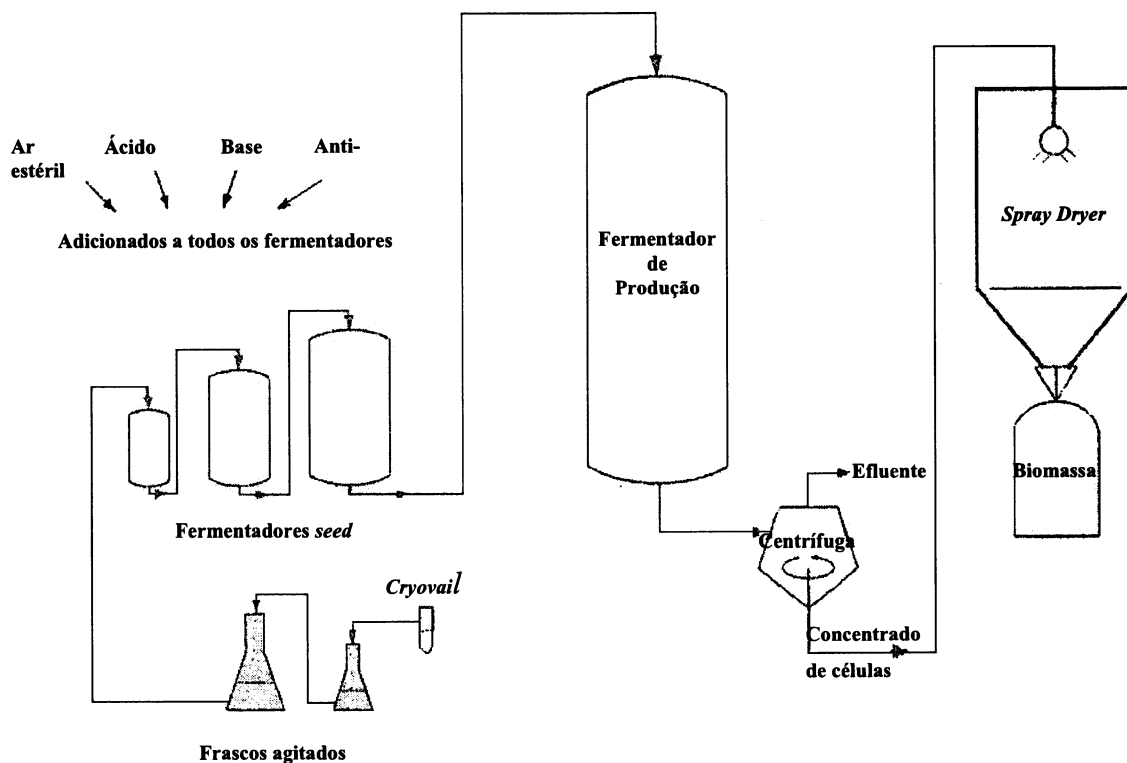


Figura 18 – Processo de fermentação utilizado na produção do SCO (DHASCO™) a partir de *C. cohnii* (Wynn et al., 2005).

O processo de extracção de óleo é semelhante ao utilizado na extracção de óleos de origem vegetal (Kyle, 1996). O óleo é extraído misturando a biomassa seca com hexano e fazendo passar a mistura por um mecanismo que promove o rebentamento das células, tornando os lípidos intracelulares mais acessíveis à extracção (Wynn et al., 2005). A ruptura das células dá origem a resíduos celulares de dimensão diversa que

terão de ser removidos (Ratledge et al., 2005). A mistura contendo o óleo extraído é sujeita a um processo de *winterização* para remover triacilgliceróis com elevado ponto de fusão e outras impurezas. Finalmente, o solvente é removido e obtém-se o óleo bruto (fig. 19).

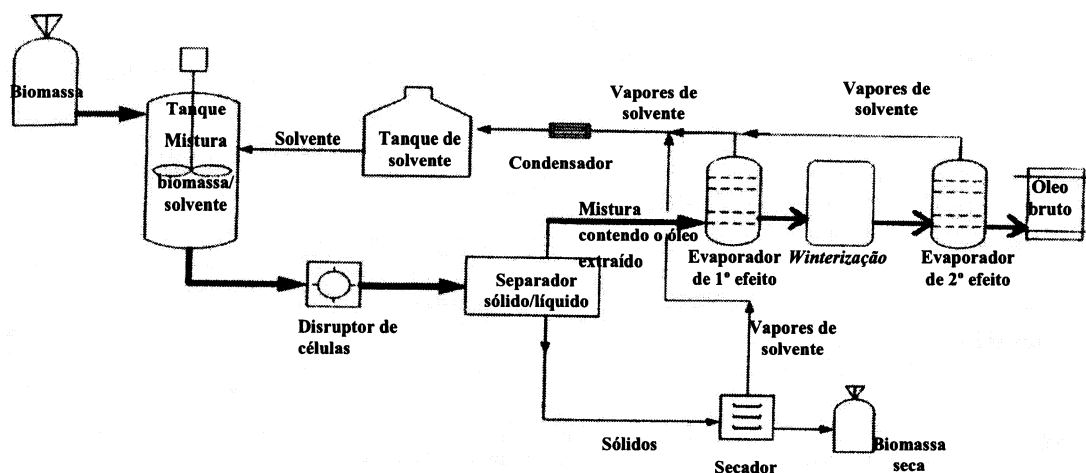


Figura 19 – Extração de triacilgliceróis a partir de *C. cohnii* para obter o DHASCO™ (Ratledge et al., 2005).

O óleo bruto obtido possui impurezas, odor e um aspecto pouco claro (Ratledge et al., 2005), é então refinado, branqueado, winterizado e desodorizado (fig. 20). Entre as impurezas e outros componentes que são removidos ou reduzidos no processo de refinação incluem-se ácidos gordos livres, água, fosfolípidos, minerais, carotenóides, esteróis, tocoferóis/tocotrienóis, ceras e restos de células (Ratledge et al., 2005).

O óleo desodorizado é diluído a 40% (m/m) de DHA por adição de óleo de girassol (Kyle, 1996; Ratledge et al., 2005; Wynn et al., 2005), estabilizado por adição de anti-oxidantes – tocoferóis (250 ppm) e ascorbil-palmitato (250 ppm) (Wynn et al., 2005) e guardado a baixa temperatura, sob a atmosfera de azoto.

Todo o processo decorre de acordo com as boas práticas de fabrico (*Good Manufacturing Practices* – GMP) para a indústria alimentar, designadas pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos (Kyle, 1996).

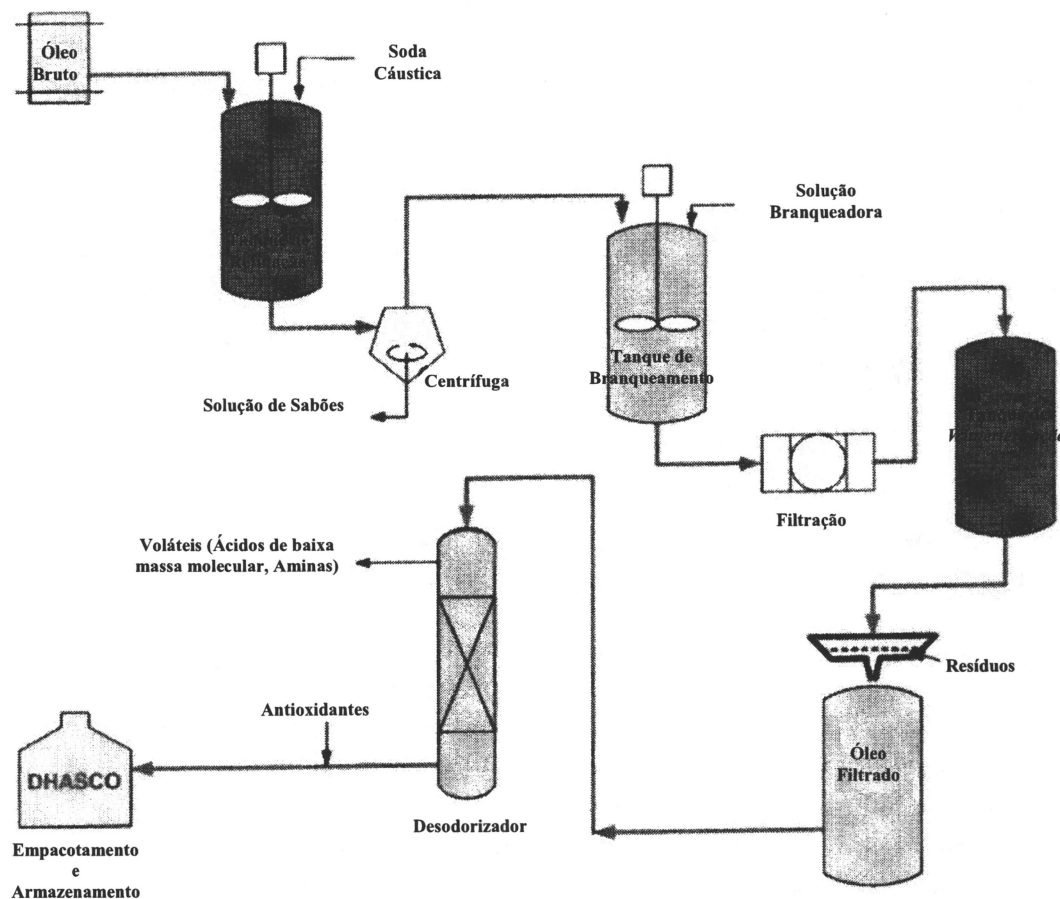


Figura 20 – *Layout* (logística) do processo de refinação do DHASCO™ (Wynn et al., 2005).

2.8 Purificação e concentração de DHA e outros ácidos gordos poli-insaturados

A produção de lípidos de origem microbiana tem-se centrado na selecção de microrganismos e na optimização das respectivas condições de cultura, tendo sido dada menos atenção ao processamento da biomassa e ao tratamento dos óleos. A maioria dos métodos de extracção aplicados aos sistemas microbianos foi originalmente descrita para tecidos animais e para plantas (Certik & Shimizu, 1999).

A produção de metabolitos intracelulares a partir de microalgas requer: a produção de biomassa apropriada em grande escala; a recolha da biomassa a partir de uma suspensão relativamente diluída; a extracção do metabolito pretendido a partir da biomassa e a purificação do extracto bruto (Molina Grima et al., 2003). Assim, em termos económicos, a produção é influenciada pelo custo da produção de biomassa, pelo

teor do metabolito na biomassa e pelo custo de purificação do metabolito (Molina Grima et al., 2003).

Ao focar-se em produtos químicos de elevado valor acrescentado, a biotecnologia das microalgas necessita não só de técnicas de cultivo em massa, mas também de desenvolver métodos de processamento posterior (Molina Grima et al., 1995) que, em muitos casos, são mais dispendiosos do que a cultura das microalgas (Molina Grima et al., 2003) e terão de ser seleccionados de acordo com a natureza das células microbianas e o tipo de extracto pretendido (Certik & Shimizu, 1999).

Tipicamente o *downstream processing* de produtos microbianos contribui com 60-80 % dos custos totais de produção (Chisti & Moo-Young, 1994; Chisti, 1998).

2.8.1 Recolha da biomassa

Antes da extracção de um óleo de origem microbiana há que recolher a biomassa. Tipicamente, os custos da recolha da biomassa do meio de fermentação representam 20-30% dos custos da sua produção (Molina Grima et al., 2003). É necessário tratar grandes volumes de caldo relativamente diluído ($< 0,5 \text{ kgm}^{-3}$ de biomassa seca, em alguns sistemas de produção comercial), com células de reduzidas dimensões (3-30 μm de diâmetro) (Molina Grima et al., 2003).

A colheita da biomassa requer uma ou mais operações de separação sólido-líquido. A biomassa pode ser colhida por centrifugação, filtração (convencional ou utilizando membranas de microfiltração ou ultrafiltração) e, em alguns casos, por sedimentação. Estes processos podem ser, eventualmente, precedidos de um passo de flotação (Molina Grima et al., 2003).

A maioria das microalgas pode ser colhida por centrifugação. No entanto, esta técnica é dispendiosa em termos energéticos e só é praticável para produtos de elevado valor acrescentado (Molina Grima et al., 2003). Este processo de separação foi também considerado o mais apropriado para prolongar o prazo de validade de concentrados para aquacultura (D'Souza et al., 2000; Heasman et al., 2000).

A colheita resulta normalmente numa concentração da biomassa algal de 50 a 200 vezes (Molina Grima et al., 2003). Tipicamente, a biomassa húmida contém, nesta fase, um teor de água de 80% (Ratledge et al., 2005).

A colheita industrial de *C. cohnii* é efectuada por centrifugação, em contínuo, e inclui uma etapa de lavagem para remoção de componentes do meio de cultura (Wynn et al., 2005).

A recolha da biomassa de *Shizochytrium* é feita directamente em secadores de tambor, evitando a centrifugação (Bailey et al., 2008).

O tratamento posterior da biomassa depende do produto pretendido mas deve fazer-se o mais rapidamente possível para evitar degradação (Molina Grima et al., 2003).

2.8.2 Pré-tratamento e ruptura celular

Os lípidos de origem microbiana podem ser extraídos directamente a partir da biomassa húmida, após a colheita (Molina Grima et al., 2003). Contudo, a menos que a biomassa tenha sido de alguma forma pré-tratada, ela contém muitas enzimas que continuam activas; algumas, tais como lipases e esterases, são inclusive activadas pelo processo de remoção das células da sua fonte de nutrientes (Ratledge et al., 2005) e podem contribuir para a degradação de constituintes intracelulares. Além disso, sob certas condições, as células podem consumir os óleos que acumularam (Ratledge et al., 2005).

Assim que a biomassa tenha sido estabilizada e as enzimas inactivadas, geralmente por aquecimento, a água pode ser removida por filtração sob pressão seguida, se necessário, de secagem (Ratledge et al., 2005). A secagem pode fazer-se recorrendo a métodos como a atomização (*spray-dryer*), a secagem em tambor ou a liofilização (Molina Grima et al., 2003) sendo que, no caso de produtos de elevado valor acrescentado, a atomização é o processo mais utilizado pelo facto da liofilização ser demasiado dispendiosa para aplicações em grande escala (Molina Grima et al., 2004).

No caso dos microrganismos produtores de DHA (*C. cohnii*, *Shizochytrium* sp. e *Ulkenia* sp.), a secagem é necessária para produzir uma biomassa que possa ser guardada durante longos períodos de tempo sem deterioração microbiana, química e sensorial (Ratledge et al., 2005; Food Standards Austrália New Zealand, 2005). Como a biomassa apresenta geralmente um limite de tempo e temperatura ao qual pode ser exposta sem decomposição do óleo, há que decidir entre longos tempos de secagem a temperaturas mais baixas ou uma breve exposição a condições mais severas. A escolha

recai normalmente sobre secadores *spray* ou *flash* com tempos de exposição curtos, que operam sob condições criteriosamente seleccionadas atendendo à sensibilidade do material ao calor (Ratledge et al., 2005).

Como o DHA está contido no interior das células (nos lípidos de reserva e nos lípidos estruturais) e os microrganismos utilizados na sua produção possuem paredes celulares rígidas, estas terão de ser rompidas para libertar o conteúdo celular (Ratledge et al., 2005). Os métodos de ruptura celular podem ser classificados em três grandes categorias: químicos, biológicos e físicos e, alguns deles, apresentam limitações no que respeita à sua aplicação em grande escala, à sua compatibilidade com o produto e ao custo (Ratledge et al., 2005).

O conhecimento da estrutura e composição da parede celular é importante na optimização de métodos químicos que garantam a lise das células, sem degradação do DHA. No que respeita aos métodos mecânicos, o tamanho, forma e grau de *cross-linking* dos polímeros estruturais determinam a facilidade de ruptura. Apesar dos métodos mecânicos, sobretudo a moagem em húmido, em moinhos de bolas de alta velocidade e em homogeneizadores de alta pressão, terem dado bons resultados na ruptura de paredes celulares de microrganismos, incluindo algas (Ratledge et al., 2005), é desejável que a ruptura celular seja o mais completa possível para permitir uma melhor penetração do solvente e aumentar o rendimento da extracção de lípidos. Isso consegue-se optimizando as variáveis do processo nomeadamente o fluxo, a pressão, a temperatura, o *design* e o funcionamento da câmara de ruptura (Ratledge et al., 2005).

A maior ou menor facilidade de ruptura celular também está relacionada com as condições de crescimento durante a fermentação. De um modo geral, taxas de crescimento superiores correspondem a células com paredes celulares mais fracas (Chisti, 1998; Ratledge et al., 2005) porque não houve tempo de produzir material para reforçar as estruturas celulares (Ratledge et al., 2005). Assim, será de esperar que *Schizochytrium* sp., que cresce mais rapidamente que *C. cohnii*, apresente uma parede celular mais fraca e mais fácil de romper (Ratledge et al., 2005). Os períodos de carência e crescimento limitados impostos no sentido de promover a acumulação de lípidos (secção 2.3.2) podem, por outro lado, levar as células a reforçar a sua parede como forma de preparar a sua sobrevivência (Ratledge et al., 2005). Em suma, a estabilidade mecânica de uma alga não é uma constante. Depende da estirpe utilizada, das condições de crescimento e do historial da biomassa (Ratledge et al., 2005) e afecta o custo, rapidez e eficiência do processamento posterior.

2.8.3 Extracção de lípidos /ácidos gordos

As algas produzem uma grande variedade de lípidos que podem ser classificados em neutros ou polares e subdivididos de acordo com a tabela 11 (Robles Medina et al., 1998).

Tabela 11 – Classificação de lípidos (Robles Medina et al., 1998).

| Lípidos neutros | Lípidos Polares | |
|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| | Fosfolípidos | Glicolípidos |
| Triacilgliceróis | Fosfatidilcolina | Sulfoquinosildiglicerido |
| Ceras | Fosfatidiletanolamina | Monogalactosildiglicerido |
| Hidrocarbonetos | Fosfatidilserina | Digalactosildiglicerido |
| Ácidos gordos livres | Fosfatidilglicerol | |
| Esteróis | Fosfatidilinositol | |

Os PUFAs podem estar presentes como triacilgliceróis, fosfolípidos e glicolípidos. Os primeiros são normalmente considerados como lípidos de reserva enquanto os fosfolípidos e glicolípidos são considerados lípidos estruturais por fazerem parte das membranas das células ou de organelos (Robles Medina et al., 1998).

Os métodos de extracção de lípidos devem ser rápidos, eficientes e suaves, de forma a minimizar a degradação dos lípidos e ácidos gordos. Os solventes de extracção devem ser baratos, voláteis (para que sejam facilmente removidos posteriormente sem deixar resíduos), livres de tóxicos ou impurezas reactivas (que reajam com os lípidos), capazes de formar um sistema bifásico com a água (para esta remover componentes não lipídicos) e não devem extrair componentes indesejáveis (proteolípidos, pequenas moléculas, etc.) (Robles Medina et al., 1998).

Para uma extracção completa, todas as ligações entre os lípidos e outros componentes não lipídicos das células têm de ser quebradas e os agentes utilizados não podem degradar os lípidos. Os lípidos participam em vários tipos de ligações: (i) interações de van der Waals, nas quais os lípidos neutros ou não polares, tais como os glicerídeos, estão ligados através da sua cadeia carbonada, a outros lípidos e a regiões hidrofóbicas de proteínas; (ii) ligações de hidrogénio e interações electrostáticas, através das quais os lípidos polares se ligam às proteínas; (iii) ligações covalentes, embora este tipo de ligação seja menos frequente (Robles Medina *et al.*, 1998).

Enquanto as interações hidrofóbicas, que ligam os lípidos de reserva, podem ser quebradas utilizando solventes não polares (clorofórmio, hexano ou éter), as ligações de hidrogénio dos lípidos polares associados à membrana necessitam de solventes polares (metanol, etanol, outros álcoois e água) e, para extrair lípidos ligados por forças electrostáticas mais fortes, tais como ligações iónicas, são necessárias variações de pH (Robles Medina et al., 1998).

O solvente ideal para a extracção de lípidos deve ser suficientemente polar para remover os lípidos das membranas celulares e, simultaneamente não muito polar de forma a dissolver os lípidos pouco polares (Somashekar et al., 2001).

Como os lípidos também estão retidos nas células por confinamento mecânico, a adição de uma pequena quantidade de água ao solvente de extracção dilata as estruturas celulares, ricas em polisacáridos, fazendo com que as mesmas fiquem túrgidas, facilitando o acesso do solvente aos lípidos e é absolutamente necessária para a extracção quantitativa dos lípidos polares (Robles Medina et al., 1998).

Por outro lado, como os microrganismos contêm enzimas que podem degradar os lípidos, durante a sua extracção é necessário inactivar essas enzimas adicionando um álcool ao solvente de extracção. O álcool também ajuda a dissolver os lípidos mais polares e a romper as ligações entre os lípidos e proteínas. No entanto, os solventes alcoólicos também extraem contaminantes tais como açúcares, aminoácidos, sais, proteínas hidrofóbicas e pigmentos que terão de ser removidos do extracto alcoólico (Robles Medina et al., 1998).

Embora tenham sido sugeridos vários solventes ou combinações de solventes para a extracção de lípidos de microrganismos, a maioria dos processos de extracção utiliza clorofórmio-metanol (2:1 v/v) tal como foi sugerido por Folch et al. (1957). No entanto, o procedimento e as etapas de extracção variam de autor para autor (Garcia Camacho et al., 1990). Num protocolo aperfeiçoado e simplificado, Bligh e Dyer (1959) utilizaram uma mistura monofásica clorofórmio-metanol-água (1:2:0,8 v/v, incluindo a água presente na amostra) para a extracção de lípidos de tecidos frescos. A mistura de extracção é diluída com clorofórmio e água e forma um sistema bifásico clorofórmio-metanol-água (2:2:1,8 v/v) em que a fase inferior é constituída por clorofórmio quase puro e contém os lípidos purificados; a fase superior é constituída sobretudo por metanol e água e contém os componentes não lipídicos. A extracção é simples rápida e suave (temperatura ambiente). A extracção dos lípidos é completa e a separação entre lípidos e não lípidos é aproximadamente quantitativa. O método é aplicável a uma

grande variedade de materiais (tecidos de animais ou de plantas e a microrganismos) e é utilizado, como rotina, na extracção de lípidos de microalgas (Robles Medina et al., 1998). No entanto, se os óleos microbianos se destinam ao consumo humano os solventes utilizados têm de ser aceitáveis em termos de toxicidade, manipulação, segurança e custo (Certik & Shimizu, 1999) e os solventes anteriormente referidos são demasiado tóxicos para serem utilizados com fins nutricionais ou farmacêuticos (Ratledge et al., 2005).

A extracção de lípidos utilizando uma mistura hexano-isopropanol (3:2 v/v), de baixa toxicidade, seguida de lavagem com sulfato de sódio aquoso para remover contaminantes não lipídicos, pode apresentar algumas vantagens em relação aos sistemas de Bligh e Dyer mas dá origem a baixos rendimentos em lípidos quando aplicada a microalgas (Molina Grima et al., 1994).

Para obter os ácidos gordos livres a partir de extractos lipídicos é necessário saponificar o extracto. Adicionando uma base à mistura de extracção podem-se extrair directamente os ácidos gordos (Molina Grima et al., 1994). A saponificação directa durante a extracção da biomassa é mais rápida e menos dispendiosa que a extracção seguida de saponificação mas exige condições de operação mais severas (1 h a 60°C ou 8 h à temperatura ambiente) e apresenta um rendimento ligeiramente inferior, para o mesmo sistema (Robles Medina et al., 1998). A extracção directa da biomassa húmida de *Phaeodactylum tricorutum* com 96% de etanol produz quase tantos lípidos (90%) como a biomassa liofilizada (96%) (Molina Grima, 1996).

Sistemas mais biocompatíveis tais como etanol (96%) e hexano/etanol (2:5 v/v) foram utilizados com sucesso na extracção dos ácidos gordos poli-insaturados obtidos por saponificação directa da biomassa liofilizada de *Phaeodactylum tricorutum* (Cartens et al., 1996; Ibanéz González et al., 1998; Ramírez Fajardo, 2007), *Isochrysis galbana* (Molina Grima et al., 1994; Robles Medina et al., 1995a) e *Phorohiridium cruentum* (Giménez Giménez et al., 1998).

Os métodos de purificação do extracto bruto baseiam-se nas diferenças de afinidade dos lípidos polares e dos contaminantes, para um dado solvente. O extracto pode ser tratado com solventes apolares como o clorofórmio, hexano e éter dietílico nos quais os contaminantes não lipídicos são menos solúveis. No entanto, este procedimento não extrai completamente os lípidos polares devido à sua baixa solubilidade nestes solventes (Robles Medina et al., 1998).

2.8.4 Concentração e purificação

Os métodos utilizados na obtenção de fracções ricas em PUFAs a partir de óleos naturais (vegetais, animais e microbianos) baseiam-se em diferenças de polaridade e/ou configuração espacial dos ácidos gordos presentes no extracto, as quais estão associadas sobretudo, ao número de ligações duplas na cadeia de átomos de carbono (Guil-Guerrero et al., 2003).

A inclusão de PUFAs em medicamentos requer a sua purificação até graus de pureza superiores a 95% (Ratledge et al., 2005). Assim, as diferentes fontes de ácidos gordos poli-insaturados competem não apenas em produtividade, concentração e custo de produção mas também na separação do ácido gordo poli-insaturado de interesse de outros similares (Ratledge et al., 2005).

De entre os métodos de concentração, apenas alguns são satisfatórios para aplicação em grande escala. Os métodos disponíveis incluem: cristalização a baixa temperatura, complexação com ureia, extracção supercrítica, separação enzimática, cromatografia de adsorção e destilação fraccionada ou molecular (Shahidi & Wanasundara, 1998). Cada técnica apresenta as suas vantagens e desvantagens. O desafio que se coloca actualmente é desenvolver processos que permitam obter concentrados de PUFAs ou de um PUFA específico a baixo custo de forma a satisfazer a procura crescente destes produtos.

2.8.4.1 Cristalização a baixa temperatura (winterização)

Winterização é o nome dado ao processo de remoção da fracção sólida que se forma nos óleos vegetais a baixa temperatura (Dueppen et al., 2003). O termo surgiu décadas atrás, para designar a prática de submeter os óleos obtidos a partir de sementes às baixas temperaturas dos meses de Inverno para depois, por filtração, separar o óleo dos sólidos sedimentados entretanto formados (Dueppen et al., 2003).

Uma mistura de ácidos gordos é líquida para temperaturas superiores ao ponto de fusão do componente com ponto de fusão mais elevado. Diminuindo a temperatura, os ácidos com maior ponto de fusão começam a cristalizar (Haraldsson, 1984).

O ponto de fusão dos ácidos gordos varia consideravelmente com o grau de insaturação e, desta forma, a separação de misturas de ácidos gordos saturados e

insaturados torna-se possível (Haraldsson, 1984). A baixas temperaturas, os ácidos gordos de cadeia longa (saturados e mono-insaturados), que possuem pontos de fusão mais elevados, cristalizam e os ácidos gordos poli-insaturados permanecem no estado líquido (Shahidi & Wanasundara, 1998).

A cristalização na ausência de solvente envolve o arrefecimento e agitação lentos; forma-se uma mistura de componentes sólidos e líquidos em que a fracção líquida é enriquecida em PUFA ω -3 (Shahidi & Wanasundara, 1998). Depois da cristalização a fase sólida pode ser separada da líquida por um processo físico.

O processo de cristalização a baixa temperatura também pode ser conduzido na presença de um solvente/mistura de solventes seleccionado(s). Aliás, a cristalização a baixa temperatura foi desenvolvida para separar alguns triacilgliceróis, ácidos gordos, ésteres e outros lípidos muito solúveis em solventes orgânicos a temperaturas acima de 0 °C, que se tornam moderadamente solúveis à medida que a temperatura baixa, até -80 °C (Shahidi & Wanasundara, 1998). Resumidamente, o processo consiste no arrefecimento do óleo, ou dos ácidos gordos, num solvente durante um tempo específico e na remoção da fracção cristalizada por filtração (Shahidi & Wanasundara, 1998). A presença do solvente influencia o diagrama de fases e, por conseguinte, o resultado da separação (Haraldsson, 1984). A solubilidade das gorduras em solventes orgânicos decresce com o aumento da massa molecular da gordura e aumenta com o aumento da insaturação da mesma tomando-se como regra que: entre ácidos gordos saturados, os de cadeia longa são menos solúveis que os de cadeia curta; os ácidos gordos saturados são menos solúveis que os ácidos gordos monoénicos e dienóicos de igual comprimento de cadeia; os isómeros *trans* são menos solúveis que os isómeros *cis* e os ácidos gordos não ramificados são menos solúveis que os ramificados (Shahidi & Wanasundara, 1998).

Os principais factores que afectam um processo de winterização são: a composição do óleo, a temperatura de cristalização, a razão óleo/solvente, a taxa de arrefecimento do óleo e a mobilidade das espécies moleculares no óleo (López-Martínez et al., 2004) sendo, portanto, necessário escolher o solvente apropriado e a temperatura mais adequada para conseguir um bom rendimento em PUFA ω -3 (Shahidi & Wanasundara, 1998). É ainda necessário seleccionar o método de arrefecimento já que este determina a forma e o tamanho dos cristais e, como tal, a eficiência da separação das fracções líquida e cristalizada (Kreulen, 1976).

Yokochi et al. (1990) estudaram o efeito das condições de winterização (solvente, concentração de óleo no solvente e temperatura) na concentração do óleo extraído do fungo *Mortierella ramanniana* em ácido γ -linolénico (GLA). Obtiveram uma eficiência de separação superior (0,27) utilizando acetona como solvente, uma concentração de óleo no solvente de 10% (m/m) e uma temperatura de -20°C ; nestas condições, o teor em GLA aumentou de 5,7% para 8,3% do total de ácidos gordos. O rendimento do processo de concentração em GLA nos diferentes solventes (para concentrações de óleo de 5-20% m/m) foi, por ordem decrescente: acetona (-20°C) > *n*-hexano (-20°C) > acetona (4°C) > éter de petróleo (-20°C) (Yokochi et al., 1990).

A preparação de concentrados de PUFAs ω -3 a partir de óleo de baleia, na forma de triacilgliceróis ou ácidos gordos livres, por cristalização a baixa temperatura utilizando hexano e acetona como solventes, mostrou que o teor em PUFAs ω -3 na fracção não cristalizada, aumentava com a diminuição da temperatura de cristalização e que, a acetona permitia obter a maior concentração em PUFAs ω -3 (na forma de triacilgliceróis) para todas as temperaturas estudadas (Shahidi & Wanasundara, 1998). A cristalização a baixa temperatura na forma de ácidos gordos livres, a -60 e -70°C em hexano, resultou num teor de PUFAs ω -3 de 58,3 e 66,7% com recuperações de concentrado de 39,0 e 24,8%, respectivamente. Em acetona, o teor de PUFAs ω -3 atingiu os 56,7 e 46,8%, mas as recuperações de concentrado foram de 15,9 e 12,9%, respectivamente (Wanasundara et al., 2002).

López-Martínez e colaboradores (2004) estudaram o enriquecimento em ácido γ -linolénico dos óleos de *Echium fastuosum* e *Borago officinalis* para concentrações de 10, 20 e 40% (m/m) de óleo, à temperatura de 4°C , -24°C e -70°C usando hexano, acetona, éter di-etílico, isobutanol e etanol como solventes e concluíram que o rendimento em GLA era superior para a razão óleo/solvente igual a 10% para todos os solventes. Os melhores resultados foram obtidos com ácidos gordos livres de *B. officinalis* em hexano atingindo um máximo de 58,8% de GLA na fracção líquida. Para *E. fastuosum* a concentração mais elevada de GLA (39,9%) também foi obtida em hexano.

Dueppen et al. (2003) patentearam um processo de extracção e winterização de lípidos, obtidos a partir de sementes vegetais ou de origem microbiana, no qual um óleo contendo predominantemente lípidos neutros e pelo menos um ácido gordo poli-insaturado, é purificado por um processo em que os lípidos contactam com um solvente polar, seleccionado de forma a que os contaminantes sejam menos solúveis nesse solvente que o PUFA pretendido. O processo é conduzido a temperaturas baixas (-2 a

2°C) para forçar a precipitação dos contaminantes. De acordo com os autores, a cristalização dos lípidos de *Schizochytrium sp.* com cinco volumes de acetona seguida de centrifugação permite obter 41% de DHA, em vez dos 37% obtidos no processo de winterização standard.

A utilização da cristalização a baixa temperatura em solventes para concentrar os ácidos gordos livres obtidos a partir do óleo de boragem foi também descrita por Chen & Ju (2001) que conseguiram aumentar o teor de GLA de 23,4 para 88,9% com um rendimento de 62% em condições optimizadas (utilização de uma mistura de 30% de acetonitrilo e 70% de acetona como solvente, uma temperatura de operação de -80°C e uma razão solvente/ácidos gordos livres de 30 mL/g).

Embora para a obtenção de fracções puras, sejam necessários vários ciclos de cristalização e separação (Haraldsson, 1984), trata-se um processo puramente físico, satisfatório em termos das actuais preocupações com a saúde e o ambiente (Timms, 2005), que requer um número mínimo de passos e equipamento simples (Schlenk, 1961). Por razões económicas e ecológicas, a cristalização na ausência de solvente ocupa um lugar de destaque na indústria de óleos e gorduras (Gibon, 2005).

2.8.4.2 Complexação com ureia

As soluções de ureia cristalizam em estruturas com empacotamento tetragonal formando canais de 5,67 Å de diâmetro (Shahidi & Wanasundara, 1998; Linder et al., 2004). Contudo, na presença de moléculas lineares de cadeia longa, a ureia cristaliza numa estrutura hexagonal formando canais de 8-12 Å de diâmetro que são suficientemente largos para incluírem cadeias alifáticas (Shahidi & Wanasundara, 1998; Linder et al., 2004) (fig. 21). Assim, a ureia pode ser utilizada para separar compostos de cadeia linear de compostos de cadeia ramificada ou cíclica (Abu-Nasr et al., 1954).

Os compostos ocluidos ligam-se à ureia por forças de van der Waals, forças de dispersão de London e atracções electrostáticas induzidas e mantêm-se unidos por uma questão de forma, tamanho e geometria (Robles Medina et al., 1998; Molina Grima et al., 1999b).

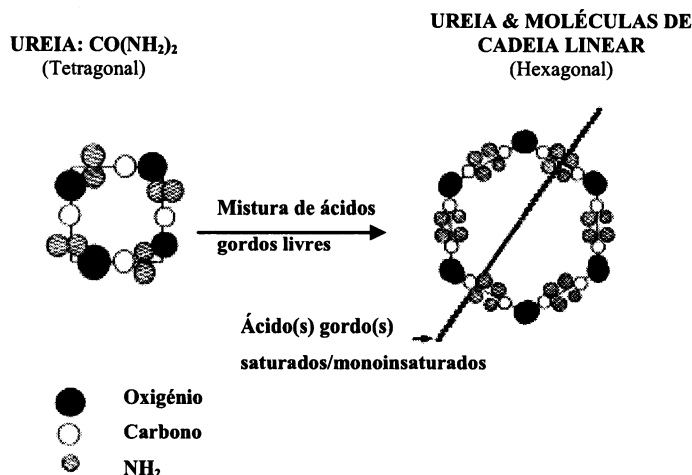


Figura 21 – Formação de cristais de ureia na ausência e na presença de ácidos gordos de cadeia longa (Shahidi & Wanasundara, 1998).

Quando a ureia cristaliza a partir de uma solução de ácidos gordos com diferentes comprimentos de cadeia e vários graus de insaturação, os ácidos gordos saturados e mono-insaturados (moléculas de cadeia longa e não ramificada) formam complexos e os ácidos gordos poli-insaturados continuam em solução (Robles Medina et al., 1998). Enquanto os ácidos gordos de cadeia linear com 6 ou mais átomos de carbono são rapidamente complexados (Shahidi & Wanasundara, 1998), a presença de ligações duplas na cadeia de carbono introduz irregularidades estereoquímicas na cadeia do ácido gordo que desequilibram as distâncias intermoleculares ótimas e reduzem as forças atractivas responsáveis pela estabilização do composto de inclusão, diminuindo a probabilidade de complexação com a ureia (Abu-Nasr et al., 1954; Robles Medina et al., 1998). Os monoenos são mais facilmente complexados que os dienos que, por sua vez, são mais facilmente complexados que os trienos (Shahidi & Wanasundara, 1998). Pelo contrário, moléculas ramificadas, cíclicas ou de cadeia linear com menos de 6 a 8 átomos de carbono raramente formam complexos com a ureia (Hayes et al., 1998). Em suma, a tendência dos ácidos gordos e ésteres para formarem complexos com a ureia diminui com o aumento da insaturação e com a diminuição do tamanho da cadeia (Abu-Nasr et al., 1954).

Durante o processo de formação de compostos de inclusão de ureia, o óleo, constituído maioritariamente por triacilgliceróis, é separado nos ácidos gordos e insaponificáveis, usando soluções alcoólicas de KOH ou NaOH; as vitaminas A e D e os xenobióticos (por exemplo, PCBs) e outros componentes indesejáveis são removidos. Os ácidos gordos livres, misturados com a solução alcoólica (metanol ou etanol) de

ureia, são então arrefecidos a uma temperatura específica dependendo do grau e concentração desejado (Shahidi & Wanasundara, 1998). A selecção de processos de arrefecimento mais lentos melhora a selectividade reduzindo o número de cristais tetragonais de ureia pura que se formam (Hayes, 2006).

Os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e, di-insaturados em menor extensão, cristalizam com a ureia e podem ser separados por filtração (Shahidi & Wanasundara, 1998; Wanasundara & Shahidi, 1999). A separação dos cristais de ureia da fracção não complexada remove os ácidos saturados e mono-insaturados de cadeia longa enriquecendo o extracto líquido em ácidos gordos insaturados (Wanasundara & Shahidi, 1999; Zuta et al., 2003).

Em alternativa o processo pode ser conduzido usando ésteres metílicos ou etílicos em vez dos ácidos gordos livres (Schlenk, 1961; Hayes et al., 1998; Shahidi & Wanasundara, 1998). Cada uma das opções apresenta vantagens e desvantagens. Por exemplo, os ácidos gordos são mais solúveis em álcool que os ésteres correspondentes. Por este motivo, necessitam de um volume de álcool muito menor para processamento. Por outro lado, se se escolher a forma de éster dos ácidos gordos o passo de re-esterificação do concentrado é eliminado (Shahidi & Wanasundara, 1998).

A técnica de complexação com ureia é muito utilizada na concentração de PUFAs com 4 ou mais ligações duplas porque permite o tratamento de grandes quantidades de produto com equipamento simples, solventes mais biocompatíveis (tais como etanol) e condições suaves (temperatura ambiente) (Robles Medina et al., 1998; Zuta et al., 2003; Hayes, 2006); a separação é mais eficiente que nos métodos de cristalização fraccionada ou extracção selectiva por solventes (Robles Medina et al., 1998) e o processo é pouco dispendioso (Robles Medina et al., 1998; Zuta et al., 2003). Trata-se de uma técnica versátil em que as características do fraccionamento podem ser alteradas por simples alteração das quantidades de solvente ou ureia (Traitler et al., 1988; Robles Medina et al., 1995a; Robles Medina et al., 1998; Reis, 2001; Guil-Guerrero & Belarbi, 2001).

Embora, segundo alguns autores, a complexação com ureia proteja os ácidos e ésteres insaturados da auto-oxidação e polimerização (Holman & Ener, 1954), a formação de etil carbamato (um carcinogénico animal) por reacção do etanol com a ureia, levanta preocupações em termos de saúde e também de impacto ambiental, à aplicação deste método (Canas, 1999) tendo Guil-Guerrero et al. (2007) sugerido que o método seja evitado se os produtos se destinarem ao consumo humano.

O metanol e o etanol são os solventes preferidos para o fraccionamento, sobretudo o primeiro, por permitir obter razões de concentração superiores (Robles Medina et al., 1995b; Cartens et al., 1996), embora a sua utilização possa dar origem à metilação, produzindo uma mistura de ácidos gordos livres e ésteres metílicos (Haagsma, 1982). A principal função do solvente é promover o contacto entre a ureia e os ácidos gordos de forma a induzir a formação dos complexos (Hayes et al., 2000). O aumento da quantidade relativa de solvente diminui a temperatura necessária para assegurar a solubilização da ureia e dos ácidos gordos; contudo, a formação de complexos com a ureia (remoção de ácidos gordos livres saturados) diminui linearmente com a concentração de solvente (Hayes et al., 1998). A formação de complexos com a ureia também diminui com o aumento do teor em água do solvente (Hayes et al., 1998).

Durante a complexação, a concentração de ureia deve ser próxima da saturação já que a concentração dos PUFAs recuperados diminui com o decréscimo da concentração de ureia (Robles Medina et al., 1998). Quando o solvente dos ácidos gordos pode formar aductos com a ureia o seu equilíbrio de complexação compete com a reacção pretendida e, portanto, deve evitar-se o uso de hidrocarbonetos de cadeia longa ou de acetona (Robles Medina et al., 1998). A agitação aumenta o número de encontros entre a ureia e as moléculas de ácidos gordos durante a cristalização permitindo que o cristal inclua as moléculas mais apropriadas (Guil-Guerrero & Belarbi, 2001).

A razão mássica ureia/ácidos gordos também pode ser utilizada para separar os ácidos gordos de acordo com a sua insaturação. Quando se utilizam quantidades de ureia insuficientes, os ácidos gordos competem entre si pela formação de complexos com a ureia e a diferença de tendências de complexação permite o fraccionamento (Robles Medina et al., 1998). Ao estudarem a influência da razão ureia:ácidos gordos (U/FA) na composição dos concentrados, obtidos a partir de um extracto de ácidos gordos de óleo de fígado de bacalhau à temperatura de 4°C Robles Medina et al. (1995a) verificaram que com uma razão U:FA de 1:1 os ácidos gordos saturados eram parcialmente eliminados enquanto a concentração dos monoinsaturados permanecia constante; com uma razão U:FA de 2:1 os ácidos gordos monoinsaturados eram parcialmente eliminados e, com uma razão U:FA de 4:1 os ácidos gordos saturados e monoinsaturados eram completamente eliminados.

A razão mássica ureia/ácidos gordos e a temperatura são as variáveis mais importantes que afectam a concentração de PUFAs. Assim, estas variáveis

experimentais devem ser criteriosamente controladas de forma a obter um conteúdo máximo de PUFAs ω -3 no concentrado com uma recuperação aceitável (Wanasundara & Shahidi, 1999).

De acordo com Robles Medina et al. (1995b), a concentração e o rendimento em PUFAs variam com a razão mássica ureia:ácidos gordos de forma diferente consoante a gama de temperaturas estudada. Para temperaturas superiores a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ a concentração de PUFAs aumentou com a razão ureia/ácidos gordos. Uma razão ureia/ácidos gordos de 4:1 mostrou ser a mais apropriada para concentrar os ácidos SA (*Stearidonic Acid*) e DHA (Robles Medina et al., 1995b; Robles Medina et al., 1998). Abaixo dos $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ o factor de concentração e o rendimento diminuíram com o aumento da razão mássica ureia/ácidos gordos, o que sugere que os PUFAs também complexam com a ureia quando sujeitos a baixas temperaturas (Robles Medina et al., 1995a; 1995b; 1998).

A tendência para formar compostos de inclusão com a ureia aumenta com a diminuição da temperatura e a temperatura óptima depende do PUFA em questão. Entre os ácidos ω -3, o DHA encontra-se quase exclusivamente na fracção não complexada com ureia em condições experimentais seleccionadas. O rendimento em PUFAs é máximo para temperaturas próximas de 4°C sendo esta temperatura particularmente adequada à concentração de SA e DHA (Robles Medina et al., 1995b; Robles Medina et al., 1998; Guil-Guerrero & Belarbi, 2001). Quanto mais elevada for a temperatura menor é a tendência dos ácidos gordos para formar aductos com a ureia e, conseqüentemente, os rendimentos em PUFAs são menores (Guil-Guerrero & Belarbi, 2001).

Ratnayake et al. (1988) consideraram que a remoção completa dos ácidos gordos saturados por complexação com ureia é virtualmente impossível uma vez que alguns ácidos gordos saturados de cadeia aberta não formam complexos com a ureia durante o processo de cristalização.

O tratamento com ureia mostrou-se útil na obtenção de concentrados de EPA e DHA a partir dos ácidos gordos livres de óleo de peixe e de microalgas (Ackman et al., 1988; Cartens et al., 1996; Senanayake & Shahidi, 2000), de GLA a partir de amora negra e boragem (Traitlet et al., 1988; Shimada et al., 1998) e de ALA a partir de óleo de linhaça (Swern & Parker, 1953) removendo os ácidos gordos saturados e monoinsaturados (Hayes et al., 2000). As condições de complexação e recolha de PUFAs obtidas por vários autores são apresentadas na tabela 12, onde se pode observar

que os factores de concentração são da mesma ordem de grandeza e tendem a diminuir com o aumento da concentração do PUFA na solução inicial.

Giménez Giménez et al. (1998) utilizaram a complexação com ureia para concentrar o EPA e AA obtidos por saponificação directa da biomassa de *Porphyridium cruentum*; utilizaram uma razão ureia/ácidos gordos de 4:1 (m/m) e temperaturas de cristalização de 4°C e 28°C. Embora tenham obtido factores de concentração semelhantes a ambas as temperaturas a recuperação foi superior à temperatura de 28°C (67.7% e 61.8% para o EPA e AA, respectivamente).

Wanasundara & Shahidi (1999) optimizaram as condições de produção de concentrados de PUFAs ω -3 a partir de óleo de baleia e obtiveram, nas condições optimizadas, 88.2 % de PUFAs ω -3 com uma razão ureia/ácidos gordos de 4,5, um tempo de cristalização de 24 h e uma temperatura de cristalização de -10°C; a recuperação foi de 21,5%.

Senanayake & Shahidi (2000) concentraram DHA a partir do óleo extraído de *C. cohnii* utilizando o fraccionamento com ureia e descreveram um enriquecimento em DHA de 47,4% para 97,1 % com um rendimento de 32,5% da massa do óleo original.

Chakraborty & Raj (2007) utilizaram o fraccionamento com ureia para concentrar o EPA presente no óleo de sardinha obtido por hidrólise química. Utilizaram metanol como solvente, diferentes temperaturas de cristalização (2, 4 e 6°C) e diferentes razões ureia/ácidos gordos (2:1, 3:1 e 4:1 m/m). Obtiveram a maior concentração de EPA (47,78%) para uma temperatura de cristalização de 4°C e uma razão ureia/ácidos gor de 4/1 (m/m).

Tabela 12 – Concentração de PUFA em extractos (X_E) e complexos de ureia (X_U) (% do total dos ácidos gordos) e factores de concentração ($f = X_U / X_E$), obtidos para os ácidos SA, EPA e DHA pelo método dos complexos de ureia.

| Referência e Condições* | Amostra | SA | | | EPA | | | DHA, GLA | | |
|--|--|-------|-------|-----|-------|-------|-----|----------|-------|------------------|
| | | X_E | X_U | f | X_E | X_U | f | X_E | X_U | f |
| Haagsma et al. (1982), 3:1, 4°C, metanol | AG de óleo de fígado de bacalhau | 2,4 | 10 | 4,2 | 12,1 | 27,6 | 2,3 | 11,7 | 44,6 | 3,8 |
| Ackman et al. (1988), 2,6:1, 5°C, etanol | AG de óleo de <i>Sabastes</i> sp. | 0,8 | 5,1 | 6,4 | 5,4 | 32,5 | 6,0 | 3,9 | 29,2 | 7,5 |
| Cohen & Cohen(1991), 4:1, -15°C, methanol | EM de óleo de <i>Porphyridium cruentum</i> | - | - | - | 47,5 | 81,9 | 1,7 | - | - | - |
| Traitler et al. (1988), 3:1, 4°C, methanol | AG de óleo de sementes de amora negra | 3,7 | 15,5 | 4,2 | - | - | - | 18,2 | 79,6 | 4,4 ^b |
| Fujita & Makuta (1983), 1,5:1, 35 °C, etanol | EE de óleo de peixe (<i>Pollachius</i> sp.) | 1,7 | 6,1 | 3,6 | 14,5 | 57,3 | 4,0 | 4,3 | 17,5 | 4,1 |
| Robles Medina et al. (1995a), 4:1, 4°C, metanol | AG de óleo de fígado de bacalhau | 2,4 | 8,5 | 3,6 | 9,4 | 25,6 | 2,7 | 11,0 | 59,9 | 5,5 |
| Robles Medina et al. (1995a), 4:1, 28°C, metanol | AG de óleo de fígado de bacalhau | 2,4 | 8,1 | 3,4 | 9,4 | 28,7 | 3,1 | 10,9 | 38,2 | 3,5 |
| Robles Medina et al. (1995a), 4:1, 4°C, metanol | AG de óleo de <i>Isochrysis galbana</i> | 7,3 | 22,6 | 3,1 | 22,4 | 39,4 | 1,8 | 6,8 | 23,4 | 3,4 |
| Cartens et al. (1996), 4:1, 28°C, metanol | AG de óleo de <i>Phaeodactylum tricornerutum</i> | - | - | - | 31,9 | 55,2 | 1,7 | 0,8 | 1,5 | 1,9 |
| Cartens et al. (1996), 4:1, 28°C, etanol | AG de óleo de <i>Phaeodactylum tricornerutum</i> | - | - | - | 31,9 | 50,3 | 1,6 | 0,8 | 1,3 | 1,6 |
| Hwang & Liang (2001), 3:1, 20°C, ciclohexano e metanol | EE de óleo de <i>Illex argentinus</i> | - | - | - | 11,8 | 28,2 | 2,4 | 14,9 | 35,6 | 2,4 |
| Hwang & Liang (2001), 3:1, 20°C, ciclohexano e metanol | EE de óleo de <i>Ommastrephes bartramii</i> | - | - | - | 4,5 | 10,1 | 2,2 | 12,7 | 30,0 | 2,4 |

* razão mássica amostra/ureia, temperatura de cristalização e solvente, respectivamente (AG- ácidos gordos livres; EM – ésteres metílicos; EE- ésteres etílicos)

2.8.4.3 Extração supercrítica

A extração supercrítica (*Supercritical Fluid Extraction – SFE*) é uma técnica de separação em que o solvente é um fluido supercrítico (*Supercritical Fluid – SF*), cujo poder de dissolução pode ser regulado através do controlo da pressão e da temperatura (Mendes, 1995).

Conhecem-se alguns gases que se comportam como solventes selectivos quando a pressões superiores ao seu valor crítico (pressões na ordem de 1000 a 2000 psig) (Shahidi & Wanasundara, 1998). A região na qual uma substância existe como fluido supercrítico é definida pela sua pressão crítica (P_c) e temperatura crítica (T_c). Na figura 22 representa-se o diagrama relativo ao CO_2 e define-se a respectiva região crítica.

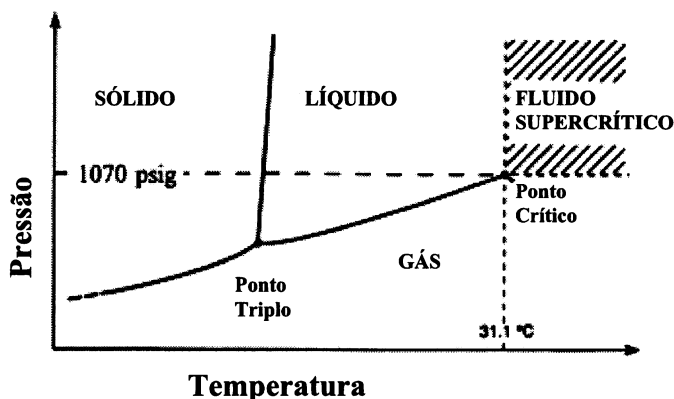


Figura 22 – Diagrama de fases para o CO_2 , mostrando a zona em que o fluido se encontra em condições supercríticas (adaptado de Shahidi & Wanasundara, 1998).

Os fluidos supercríticos possuem propriedades que os tornam solventes únicos. O seu poder solvente é tanto maior quanto maior for a sua densidade, a qual aumenta com a pressão para uma dada temperatura. Quando atingem densidades próximas das dos líquidos, apresentam um poder solvente comparável a estes, com a vantagem das suas viscosidades e difusividades serem intermédias entre as dos gases e líquidos. O facto das viscosidades e das difusividades dos fluidos supercríticos serem menores e maiores, respectivamente, que as dos líquidos poderá conduzir a uma maior eficiência da SFE comparativamente à extração convencional com solventes. O facto da tensão superficial dos SF ser muito pequena constitui uma vantagem adicional, já que facilita a penetração dos mesmos nas estruturas microporosas (Mendes, 1995).

Muitos dos solventes orgânicos utilizados no processo tradicional de extração são tóxicos e de difícil remoção dos extractos. Este facto tem consequências negativas nos sectores alimentar, farmacêutico e cosmético e faz com que os produtos extraídos utilizando estes solventes sejam sujeitos a exigências legais e regulamentares ao nível quer da produção quer da comercialização.

O CO₂ pelo facto de não ser tóxico, nem inflamável, nem corrosivo, não ter cheiro nem sabor, ser barato, inerte, facilmente removido dos extractos e aceitável em termos ambientais e, além disso, apresentar uma temperatura e pressão críticas moderadas (31,1 °C e 1070 psig), que permitem fazer a extração em condições que limitam a auto-oxidação, decomposição e/ou polimerização dos PUFA's presentes no óleo, é o fluido supercrítico mais utilizado na extração de produtos biológicos, farmacêuticos e alimentares (Mendes, 1995; Robles Medina et al., 1998; Bernardo-Gil et al., 2002; Tanaka & Ohkubo, 2003; Tanaka et al., 2004; Wisniak & Korin, 2005).

A qualidade dos produtos obtidos por extração supercrítica é normalmente superior à dos produtos obtidos pelos métodos convencionais porque, para além de estarem livres de solventes orgânicos, também estão livres de metais pesados, nitratos e pesticidas (Mendes, 1995).

Contudo, a utilização de CO₂ como fluido supercrítico também apresenta algumas desvantagens, nomeadamente: o equilíbrio de fases entre o solvente supercrítico e o soluto pode ser muito complexo; o CO₂, sendo um composto não polar apenas dissolve bem os compostos não polares; a adição de cosolventes ao CO₂ (para alterar a sua polaridade) pode deixar resíduos desses solventes no extracto, sendo necessário um processo subsequente de eliminação dessas impurezas; a adição de cosolventes complica o *scale-up*; a utilização de altas pressões torna o equipamento dispendioso e dificulta a introdução contínua de sólidos no extractor; os custos de operação também são elevados (Bernardo-Gil et al., 2002).

Na figura 23 encontra-se esquematizada uma unidade de extração supercrítica utilizada em instalações laboratoriais.

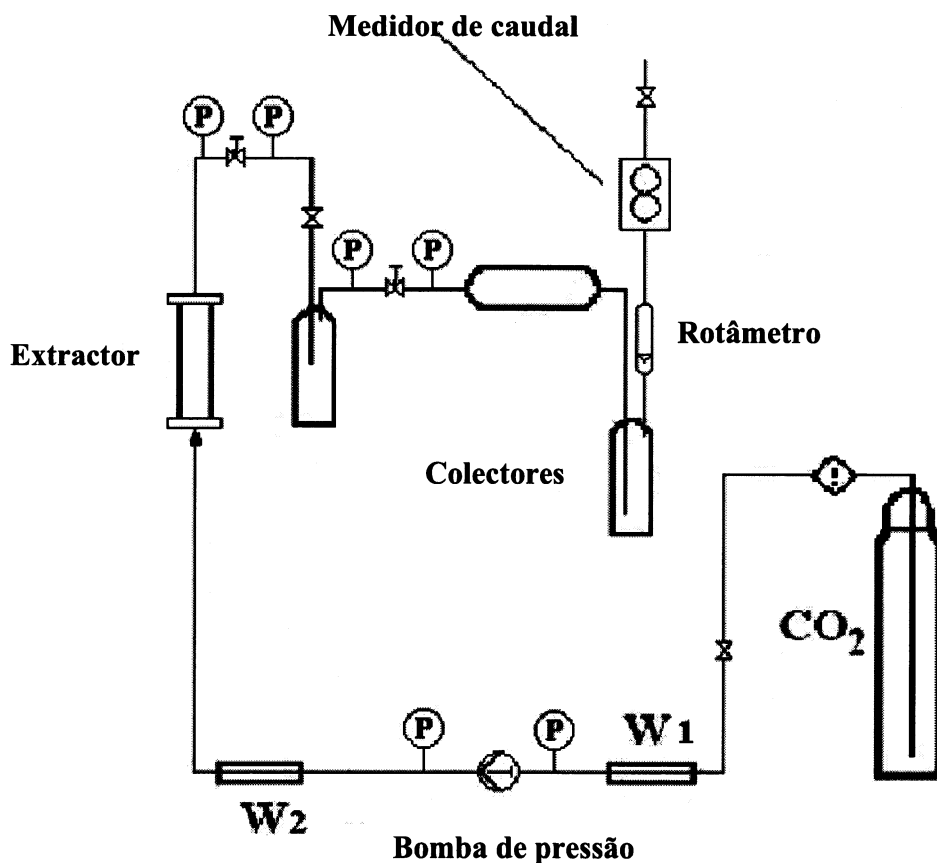


Figura 23 – Esquema de uma unidade de extracção supercrítica (Bernardo-Gil et al., 2002).

As unidades de extracção normalmente utilizadas nos ensaios laboratoriais são constituídas por: um reservatório de CO₂, um permutador de calor para refrigeração do CO₂ (W1), uma bomba de pressão, um permutador de calor para aquecer o solvente até à temperatura de extracção (W2), o extractor, a zona de recolha dos extractos, um rotâmetro e um medidor de gás (Bernardo-Gil et al., 2002).

O dióxido de carbono abandona o reservatório e passa por um permutador de calor (W1) onde é arrefecido desde a temperatura ambiente até próximo dos 278 K, para garantir que está totalmente líquido à entrada da bomba. De seguida o CO₂ é comprimido pela bomba até à pressão de trabalho e aquecido, no permutador W2, até à temperatura de funcionamento (acima do ponto crítico e cujo valor depende do composto a extrair) antes de dar entrada no extractor, previamente carregado com o material a extrair e que se encontra termostaticado. Depois de atravessar o leito sólido no extractor, o CO₂ sai pelo topo contendo uma determinada quantidade de soluto dissolvido e passa pela zona de expansão e de recolha. A quantidade de extracto depositada nos colectores é determinada por pesagem. A tubagem em redor dos

colectores é lavada com acetona ou hexano, dependendo dos produtos extraídos. Os extractos obtidos são separados do solvente usando um evaporador rotativo de vácuo. A quantidade de CO₂ utilizada é determinada através de um medidor de gás (Bernardo-Gil et al., 2002).

Com o objectivo de aumentar a solubilidade e/ou a selectividade pode ser adicionado ao FSC um composto com pressão de vapor intermédia entre a dele e do produto a extrair. Estes compostos, promotores da solubilidade, são referidos na literatura como *entrainers* ou como cosolventes (Mendes, 1995). Entre as substâncias mais utilizadas com este propósito encontra-se o metanol, o etanol, o acetonitrilo, a água e o diclorometano em concentrações que variam de 1 a 30% (Wisniak & Korin, 2005).

A extracção supercrítica tem sido utilizada na extracção e produção de concentrados de PUFAs a partir de peixe e crustáceos (Yamagouchi et al., 1986; Shahidi & Wanasundara, 1998).

O CO₂ supercrítico foi considerado o melhor solvente para concentrar os ésteres de PUFAs preparados a partir de óleo de peixe (Spinelli et al., 1987; Stout & Spinelli, 1987). A extracção com CO₂ supercrítico a pressões de 13,79-24,13 MPa e temperaturas de 24-80 °C permitiram separar os ésteres principalmente de acordo com o tamanho de cadeia mas também, em menor extensão, de acordo com o grau e tipo de insaturação presente. A temperaturas mais elevadas, o CO₂ supercrítico tornou-se menos denso e a solubilidade dos ésteres diminuiu. Os componentes de cadeia mais curta tornaram-se mais solúveis que os de cadeia mais longa, aumentando a selectividade do processo (Stout & Spinelli, 1987). A passagem de CO₂ supercrítico permitiu obter fracções contendo 57-64 % de DHA e/ou 19-23% de EPA a partir de uma mistura de ésteres de óleo de peixe contendo 8-10% destes ácidos gordos (Stout & Spinelli, 1987).

Tanaka & Ohkubo (2003) extraíram ovas liofilizadas de salmão com CO₂ supercrítico a pressões entre 9,8-31,4 MPa e temperaturas de 40-80°C para clarificar as condições de extracção e o comportamento dos lípidos em CO₂ supercrítico. Verificaram que a solubilidade dos triacilgliceróis contendo DHA se altera completamente com as condições de extracção. Registaram um aumento significativo da concentração de DHA a 80 °C. A 60 e 40 °C a concentração de DHA a 17,7 MPa foi significativamente inferior à obtida a 24,5 e 31,4 MPa. A 17,7 MPa a concentração de DHA aumentou com a temperatura de extracção. A 24,5 MPa a concentração de DHA a 80 °C foi significativamente mais baixa que a 40 e 60 °C.

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente na utilização da extracção supercrítica como método para preparar produtos bioquímicos de elevado valor acrescentado a partir de algas. A técnica tem sido utilizada na obtenção de lípidos, ácidos gordos tais como o EPA e carotenóides tais como o β -caroteno (Wisniak & Korin, 2005), compostos que podem facilmente ser degradados já que são sensíveis ao calor, à luz e ao oxigénio.

Perritti et al. (2003) extraíram o óleo de *Isochrysis galbana* Parke com CO₂ supercrítico a diferentes temperaturas e pressões utilizando etanol como cosolvente. Obtiveram rendimentos de 4-10% em lípidos com CO₂ a 690 bar e 40°C e rendimentos de 5-11% com CO₂/etanol, inferiores aos obtidos na extracção com clorofórmio/etanol 1/1 (v/v) (15-28%).

Sendo um procedimento relativamente dispendioso, a aplicação da extracção supercrítica em alternativa à extracção da biomassa húmida de algas, só pode ser considerada para produtos de elevado valor acrescentado (Wisniak & Korin, 2005).

Nos processos de extracção por fluidos supercríticos, a separação dos solutos faz-se por despressurização e/ou arrefecimento do fluido (que passa à fase gasosa), seguida da recolha dos solutos extraídos e os custos de recompressão do fluido para a fase supercrítica são elevados (de Moura et al., 2007).

A associação do processo de extracção por fluidos supercríticos com a separação por membranas permite integrar a reacção de extracção pelo CO₂-supercrítico e a separação selectiva pela membrana, através da filtração da mistura supercrítica (CO₂-supercrítico + solutos extraídos), sem necessidade de expansão do fluido supercrítico (de Moura et al., 2007). Esta associação traduz-se numa importante economia energética (custos de recompressão) (de Moura et al., 2007).

Serrade et al. (1998) utilizaram a associação da extracção de CO₂-SC e a separação através de membranas de nanofiltração no fraccionamento de triacilgliceróis de óleo de peixe.

A associação do processo de extracção por fluidos supercríticos com a separação por membranas constitui uma ferramenta de grande impacto económico e ambiental e pode ser considerada uma tecnologia limpa e segura quando comparada com processos que envolvem extracção e purificação com solventes orgânicos (de Moura et al., 2007).

2.8.4.4 Métodos enzimáticos

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) podem catalisar a esterificação, a hidrólise ou a permuta de ácidos gordos em ésteres (Langholz et al., 1989; Yadwad et al., 1991). O sentido e a eficiência da reacção podem ser determinados pela escolha das condições experimentais (Yadwad et al., 1991). A reacção é reversível e, em condições de baixo teor de água, a enzima funciona no sentido inverso, isto é, o da síntese de uma ligação éster (Miller et al., 1988).

Na figura 24 representam-se esquematicamente as reacções catalisadas por lipases (hidrólise, esterificação e interesterificação).

Reacção de Hidrólise

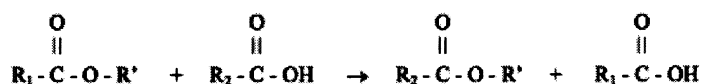


Reacção de Esterificação

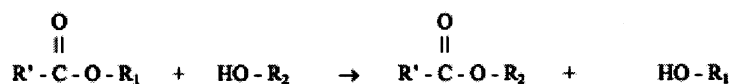


Reacção de Intesterificação

Acidólise (reacção de éster com ácido)



Alcoólise (reacção de éster com álcool)



Transesterificação (reacção de éster com

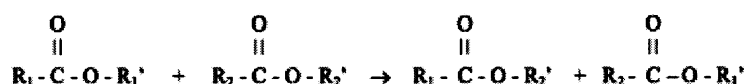


Figura 24 – Representação esquemática das reacções de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases (Carvalho et al., 2003).

A utilização de enzimas na produção de PUFA ω -3 apresenta vantagens sobre os métodos tradicionais (separação cromatográfica, destilação molecular, etc.) que, por envolverem valores de pH extremos e temperaturas elevadas, podem destruir parcialmente os PUFA ω -3 *cis* por oxidação, por isomerização *cis-trans*, por migração de duplas ligações (Wanasundara & Shahidi, 1998a; Haraldsson, 2001) ou polimerização (Haraldsson, 2001). As reacções enzimáticas, pelo facto de utilizarem condições suaves (temperaturas inferiores a 50°C, pH 6-8 e menos produtos químicos) constituem uma alternativa promissora aos métodos tradicionais (Wanasundara & Shahidi, 1998a; Gámez-Meza et al., 2003) que pode também poupar energia e aumentar a selectividade (Wanasundara & Shahidi, 1998a).

A velocidade das reacções enzimáticas é afectada por diversos factores, incluindo: (i) a natureza da enzima (actividade, posição e especificidade para o substrato, etc.); (ii) a concentração e razão dos reagentes; (iii) a composição dos óleos ou mistura de ácidos gordos; (iv) se é utilizado um solvente orgânico e qual a sua natureza; (v) o teor em água e o sistema de eliminação de água; (vi) temperatura; (vii) método de agitação e (viii) tipo de reactor (Robles Medina et al., 1998).

Hidrólise

Num processo de hidrólise típico a enzima é dissolvida num tampão apropriado ao qual o óleo é adicionado. A mistura é então agitada a uma determinada temperatura. Retiram-se amostras, em intervalos de tempo fixos, até que a percentagem de hidrólise pretendida seja atingida e adiciona-se álcool para desactivar a enzima; titula-se a amostra para determinar o conteúdo de ácidos gordos livres e, desta forma, determina-se a percentagem de hidrólise (Shahidi & Wanasundara, 1998).

Nos últimos anos tem sido dada muita atenção às lipases microbianas para produção de concentrados de PUFA ω -3 na forma de acilgliceróis por hidrólise de óleos marinhos (Hoshino et al., 1990; Yadwad et al., 1991; Tanaka et al., 1992; Shimada et al., 1994; Maehr et al., 1994). A hidrólise total ou parcial dos triacilgliceróis dá origem a diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos gordos livres (Carvalho et al., 2003).

Bottino et al. (1967) elucidaram o mecanismo de resistência às lipases por parte dos PUFA ω -3 presentes nos óleos marinhos. A presença de ligações duplas em configuração *cis* nos ácidos gordos impõe “curvaturas” nas cadeias de átomos de

carbono e estas fazem com que o terminal metilo do ácido fique próximo da ligação éster impedindo estereoquimicamente as lipases. A presença de 5 ou 6 lições duplas no EPA e DHA, respectivamente, aumenta o impedimento estereoquímico e impede as lipases de atingir a ligação éster destes ácidos gordos ao glicerol. Pelo contrário, os ácidos gordos saturados e monoinsaturados não apresentam impedimento estereoquímico e podem ser facilmente hidrolisados. Assim, a selectividade das lipases para o EPA e DHA tem permitido obter concentrados destes ácidos a partir de óleos marinhos (Shahidi & Wanasundara, 1998).

Yadwad et al. (1991) utilizaram uma lipase de *Rhizopus niveus* para concentrar em DHA óleo de peixe. Partindo de óleo de fígado de bacalhau, com um teor de DHA de 9,64% (m/m) obtiveram um teor de DHA de 29,17% (m/m) na fracção dos monoacilgliceróis e teores de 5,72, 9,95 e 15,16% nas fracções dos ácidos gordos livres, triacilgliceróis e diacilgliceróis, respectivamente.

Tocher et al. (1986), partindo do pressuposto de que o EPA e DHA se localizavam preferencialmente na posição *sn-2* dos fosfolípidos de peixe, descreveram a preparação de PUFAs ω -3 utilizando fosfolipase A2 e ovas de bacalhau; obtiveram um produto com 24 e 40 % (do total de ácidos gordos livres) em EPA e em DHA, respectivamente.

Os acilgliceróis são considerados uma forma mais favorável em termos nutricionais que os ésteres metílicos dos ácidos gordos por se ter observado, em estudos laboratoriais com animais, uma fraca absorção intestinal de ésteres alquilo (Wanasundara & Shahidi, 1998a; Wanasundara et al., 2002).

Tanaka et al. (1992) utilizaram 6 lipases microbianas (*Candida cylindracea*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus* e *Chromobacterium viscosum*) para hidrólise de óleo de peixe e de óleo de atum. Após hidrólise, obtiveram um aumento de três vezes no conteúdo inicial de DHA na fracção não hidrolisada do óleo de peixe e um aumento de 25 para 53% de DHA (aproximadamente duas vezes) na fracção dos acilgliceróis, usando lipase de *Candida cylindracea*.

Hoshino et al. (1990) também testaram várias lipases na hidrólise selectiva de óleo de fígado de bacalhau e de óleo de sardinha. Obtiveram os melhores resultados (teor em PUFAS ω -3 mais de duas vezes superior ao do óleo original) com a lipase de *Candida cylindracea* e com a lipase 1,3-específica de *Aspergillus niger*. Os autores estudaram também o efeito da temperatura (15-40°C) na concentração de PUFAs ω -3

tendo verificado que as temperaturas mais baixas, apesar de não melhorarem a concentração, preveniam o aparecimento de odores indesejáveis.

A lipase de *Geotrichum candidum* também produziu acilgliceróis enriquecidos em EPA e DHA. Shimada et al. (1994) trataram óleo de atum (30,3% DHA e 8,2% EPA) com esta enzima e com lipase obtida de *Candida cylindracea*. Através de vários ciclos consecutivos de hidrólise, a enzima de *Geotrichum candidum* deu origem a acilgliceróis contendo 46,6% de DHA e 10,9% de EPA, enquanto a lipase de *Candida cylindracea* produziu acilgliceróis contendo 58,5% de DHA e 7,1 % de EPA (não concentrou o EPA). Além disso, o teor de triacilgliceróis nos acilgliceróis produzidos com lipase de *Geotrichum candidum* (85,5%) foi superior ao obtido com *Candida cylindracea* (74,2%).

Wanasudara & Shahidi (1998a) estudaram o enriquecimento em PUFAs ω -3 nos óleos de baleia e de *menhaden* por hidrólise enzimática. Testaram as lipases microbianas (*Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus niveus*, *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum* e *Pseudomonas* sp.) e verificaram que todas as lipases aumentavam o teor em PUFAs ω -3 nos acilgliceróis de ambos os óleos. Ao fim de 40 h de hidrólise com lipase *Candida cylindracea*, obtiveram concentrações de PUFAs ω -3 no óleo de baleia de 43,5% (9,75 % EPA, 8,61% DPA e 24,0 % DHA) e de 44,1% no óleo de *menhaden* (18,5% EPA, 3,62% DPA e 17,3% DHA). Contudo, para o óleo de *menhaden*, os melhores resultados em termos de PUFAs ω -3 (aumento de 30% para 44,6% de PUFAs ω -3) e de DHA (aumento de 10,1% para 23,5%) foram obtidos com lipase *Rizopus oryzae*, no mesmo tempo de hidrólise. Os autores constataram também, em ambos os óleos, uma diminuição do teor em EPA no decurso da reacção de hidrólise quando utilizavam lipase de *Rizopus oryzae* e atribuíram este facto a uma possível especificidade da enzima para a cadeia acilo deste ácido gordo.

Wanasudara & Shahidi (1998b) optimizaram as condições de produção de concentrados de ácidos gordos ω -3 a partir de óleo de baleia e de *menhaden* por hidrólise enzimática com lipase de *Candida cylindracea* e obtiveram máximos de PUFAs ω -3 de 54,3 % no óleo de baleia (concentração de enzima de 308 U/g óleo, 40 h e 37 °C) e de 54,5 % no óleo de *menhaden* (340 U/g óleo, 45 h e 38 °C).

Carvalho et al. (2002) testaram quatro lipases microbianas na produção de concentrados enriquecidos em PUFAs ω -3 na fracção não hidrolisada dos acilgliceróis

de óleo de sardinha do Brasil. Obtiveram os melhores resultados com lipase de *Candida cylindracea* com a qual obtiveram um aumento do teor de DHA de 10,2% (no óleo original) para 22,5 %, ao fim de 16 h de reacção à temperatura de 35°C.

Huang et al (2002) descreveram a preparação de acilgliceróis ricos em DHA a partir dos óleos de *Schizochytrium limacinum* SR21 e *Thraustochytrium* sp. utilizando lipase de *Candida rugosa*. Utilizando 800 unidades/g óleo de *Schizochytrium*, durante 24 h e à temperatura de 37°C verificaram que a percentagem de DHA nos acilgliceróis aumentou de 40,5% para 67,3%. A lipase também se mostrou eficaz para aumentar a percentagem de DHA nos acilgliceróis de *Thraustochytrium*. Neste caso, a percentagem de DHA na fracção dos acilgliceróis passou de 30,7% para 63,0%.

Gámez-Meza et al. (2003) utilizaram a hidrólise enzimática de óleo de sardinha, seguida de complexação com ureia, para obter concentrados de EPA e DHA. Para a hidrólise, testaram cinco lipases comerciais de *Pseudomonas* (3 imobilizadas e 2 solúveis) e obtiveram maior percentagem de hidrólise (81,5% e 72,3% do teor inicial no óleo de sardinha para o EPA e DHA, respectivamente) com PS-CI (uma lipase obtida de *Pseudomonas* sp. imobilizada numa cerâmica quimicamente modificada) ao fim de 24 h. Concluíram que a actividade hidrolítica das enzimas dependia não só da sua origem, (espécie de *Pseudomonas*) mas também a sua preparação (livre ou imobilizada).

Esterificação

A reacção de esterificação é a reacção inversa da hidrólise do acilglicerol correspondente. A relação entre a velocidade da reacção directa (hidrólise) e inversa (esterificação) é normalmente controlada pelo conteúdo em água do meio reaccional (Carvalho et al., 2003). Osada et al. (1990) utilizaram as lipases *Chromobacterium viscosum* e *Candida cylindracea* para esterificação directa de glicerol com ácidos gordos, incluindo EPA e DHA. Os melhores resultados foram obtidos com a lipase *Chromobacterium viscosum* (rendimentos de reacção de 89-95%). Com a lipase de *Candida cylindracea* os autores obtiveram rendimentos de 71-75% para todos os ácidos gordos testados, à excepção do DHA para o qual o rendimento da esterificação foi de 63%.

Li & Ward (1993b) descreveram a síntese enzimática de acilgliceróis a partir de glicerol e de um concentrado de PUFAs ω -3 em solvente orgânico. Obtiveram melhores resultados com as lipases de *Pseudomonas* sp. e de *Mucor miehei* utilizando iso-octano e hexano como solventes. Os produtos da reacção eram constituídos por uma mistura de

monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis e ácidos gordos livres sendo a quantidade de triacilgliceróis formada inferior à de monoacilgliceróis e diacilgliceróis. Ao fim de 24 h e com a lipase de *Pseudomonas sp.* a concentração de mono, di e triacilgliceróis atingiu 23,8, 40,6 e 18,1%, respectivamente, contendo a fracção dos monoacilgliceróis 33,5% de EPA e 42,5% de DHA, a a fracção dos diacilgliceróis 33,8% de EPA e 44,7% de DHA e a fracção dos triacilgliceróis 36,5% de EPA e 40,4% de DHA.

Robles Medina et al. (1999) obtiveram 93,5 % de triacilgliceróis contendo 25,7% de EPA e 44,7 % de DHA usando óleo de fígado de bacalhau em condições optimizadas. Nas mesmas condições, obtiveram 89,3 % triacilgliceróis (com 45,6 % de EPA e 43,4% de AA) usando óleo da microalga *Porphyridium cruentum*, em meio reaccional orgânico e a lipase NOVOZYM 435 de *Candida antarctica* para catalisar a reacção.

Foglia & Sonnet (1995) aumentaram a concentração de ácido γ -linolénico de 24,9% em relação ao total de ácidos gordos de óleo de boragem para 71,8% na fracção de ácidos gordos não esterificados com butanol, após 48 h de reacção catalizada por lipase de *Geotrichum candidum*.

Shimada et al. (1997) descreveram um processo de concentração de DHA por esterificação dos ácidos gordos livres, obtidos a partir de óleo de atum, com 1-decanol na presença de lipase de *Rhizopus delemar*. Em condições optimizadas, 72% dos ácidos gordos livres foram esterificados e 84% do DHA foi recuperado na fracção não esterificada. O teor de DHA na fracção dos ácidos gordos aumentou de 23 para 73%. A repetição do processo de esterificação permitiu atingir um teor de DHA de 89% com uma recuperação de 71 % em relação ao inicial.

A esterificação de ácidos gordos livres obtidos a partir de vários óleos de peixe (atum, arenque, sardinha, etc.) com glicerol, catalisada por lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada, na ausência de solvente e em condições de deficiência de água, resultou numa separação eficiente do EPA e do DHA (Halldorsson et al., 2003). Por exemplo, quando os ácidos gordos livres de um óleo de atum com 5% EPA e 25% DHA foram esterificados com glicerol, os autores obtiveram uma conversão de 90% em acilgliceróis, ao fim de 48 h. Os ácidos gordos livres residuais continham 78% de DHA e apenas 3% de EPA; a recuperação de DHA foi de 79% e a recuperação de EPA, na fracção do acilglicerol, foi de 91%.

Ramírez Fajardo et al. (2006) aumentaram o teor de EPA nos extractos de ácidos gordos livres obtidos a partir de um óleo comercial (43,1% EPA) e de um óleo de *Phaeodactylum tricornutum* (23,0% EPA) por esterificação enzimática. Testaram nove lipases e, apesar de todas concentrarem o EPA na fracção não esterificada, a lipase obtida de *Pseudomonas fluorescens* mostrou-se superior. Em condições optimizadas, o EPA foi concentrado a 72% e 71% no óleo comercial e no óleo de *Phaeodactylum tricornutum*, respectivamente com rendimentos de recuperação de 73 e 75,5%, respectivamente.

Interesterificação

Na reacção de interesterificação, o triacilglicerol reage com um ácido gordo, um álcool ou outro éster, dá origem a um rearranjo na distribuição dos ácidos gordos do triacilglicerol e forma-se um novo triacilglicerol, com propriedades físicas e químicas diversas (Carvalho et al., 2003). O processo de interesterificação é utilizado para modificar a estrutura e a composição de óleos e gorduras de modo a melhorar as suas propriedades físicas e nutricionais (Basheer et al., 1995).

A concentração de água é de importância crucial na determinação do equilíbrio químico das reacções efectuadas em sistemas com solventes orgânicos. Uma elevada concentração de água no meio reaccional desloca o equilíbrio no sentido da hidrólise e um baixo teor de água desloca o equilíbrio no sentido da interesterificação; a concentração óptima deve ser suficientemente baixa para minimizar a ocorrência de produtos de hidrólise e suficientemente elevada para que a enzima mantenha a sua actividade (Basheer et al., 1995).

Haraldsson et al. (1989) prepararam triacilgliceróis enriquecidos em PUFAs ω -3 (70%) e, em particular, em DHA (48%) e EPA (12%) por interesterificação de óleo de fígado de bacalhau com concentrados de ácidos gordos livres ou dos seus ésteres, catalisada por uma lipase 1,3-específica obtida de *Mucor miehei* imobilizada. Esta foi também a enzima utilizada por Yamane et al. (1992) para preparar óleo de sardinha e óleo de fígado de bacalhau modificados contendo 25% de EPA e 40% de DHA por acidólise entre óleo e ácidos gordos livres, na ausência de solvente.

Haraldsson & Thorarensen (1999) utilizaram a lipase 1,3 regioespecifica de *Rhizomucor miehei* imobilizada para catalisar a reacção de acidólise da 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina com PUFAs n-3 na ausência de solvente e obtiveram fosfolípidos com teores de 32% de EPA e 16% DHA.

Haraldsson et al. (1997) transesterificaram óleo de peixe com etanol em condições anidras com 17 lipases diferentes. Entre as lipases estudadas verificaram que as obtidas a partir de *Pseudomonas* apresentavam uma elevada actividade para os ácidos gordos saturados e monoinsaturados presentes no óleo de peixe e, simultaneamente, uma actividade muito baixa para o EPA e para o DHA. Partindo de um substrato de triacilgliceróis de óleo de peixe (contendo 15% de EPA e 9% de DHA), obtiveram uma conversão de 50% em ésteres etílicos em 24 h e à temperatura de 20°C. Os ácidos gordos saturados e monoinsaturados reagiram deixando os PUFAs ω -3 na mistura residual de mono, di e triacilgliceróis. Esta mistura era constituída por aproximadamente 50% EPA+DHA, sendo a recuperação de DHA e EPA superior a 80 e 90%, respectivamente.

Da transesterificação de óleo de atum (contendo 6% de EPA e 23% de DHA) com etanol, catalisada por lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em condições anidras, resultou uma conversão de 65% em ésteres etílicos, ao fim de 24h (Haraldsson & Kristinsson, 1998); a mistura de acilgliceróis residual continha 49% de DHA e 6% de EPA sendo a recuperação do DHA de 90% na mistura de acilgliceróis e a de EPA de 60 % nos ésteres etílicos. Estes resultados foram, no entanto, inferiores aos obtidos por esterificação directa dos ácidos gordos livres obtidos a partir do mesmo óleo de atum nas mesmas condições. Nesse caso, atingiu-se uma conversão de 68% ao fim de apenas 8 h, sendo a mistura residual constituída por 74% de DHA e apenas 3% de EPA. As recuperações de DHA e EPA foram de 83 e 87%, respectivamente (Haraldsson & Kristinsson, 1998).

A reacção de interesterificação também tem sido utilizada para enriquecer óleos vegetais em PUFAs com interesse nutricional. Li & Ward (1993a) descreveram a incorporação de PUFAs ω -3 (obtidos por tratamento de óleo de fígado de bacalhau com ureia) em seis óleos vegetais (milho, soja, colza, azeite, amendoim e girassol) catalisada por lipase de *Mucor miehei* imobilizada. Verificaram que a incorporação de EPA era sempre superior à de DHA variando a primeira de 7,24% a 14,53% e a segunda de 2,7% a 6,47% do total de ácidos gordos.

A incorporação de PUFAs ω -3 em óleo de soja após transesterificação catalisada por lipase de *Candida cylindracea* deu origem triacilgliceróis com 34,7% e 32,9% de EPA e DHA, respectivamente (Huang & Akoh, 1994).

Akoh et al. (1996) incorporaram mais de 43% de EPA no óleo de Primavera-das-Boticas por interesterificação com lipase de *Candida antarctica*. Anteriormente, a

transesterificação da trilinoleína com ésteres etílicos de EPA e de DHA usando lipase de *Candida antarctica* e de *Mucor miehei* permitiu obter 81,4% e 79,6% de EPA e 79,7 e 70,5% de DHA, respectivamente (Akoh et al., 1995).

Ramírez Fajardo et al. (2003) utilizaram lipases imobilizadas, obtidas de *Rhizomucor miehei* e de *Alcaligenes sp.*, para enriquecer óleo de palma em PUFAs ω -3. Os autores estudaram as reacções de acidólise e interesterificação em hexano. Após 24 h de incubação com lipase de *Rhizomucor miehei*, por acidólise, tinha sido incorporado 20,8% de EPA e 15,6% de DHA no óleo de palma. Percentagens de incorporação superiores (29,6% de EPA e 20,8% de DHA) foram obtidas utilizando concentrado de óleo de peixe (rico em PUFAs ω -3) na forma de ésteres etílicos (reacção de interesterificação) e lipase de *Rhizomucor miehei*.

Garcia et al. (2008) enriqueceram lecitina com ácidos gordos ω -3 (concentrado de óleo de peixe saponificado) por acidólise catalisada por fosfolipase A1 imobilizada. Obtiveram os melhores resultados para uma razão molar 1:8 (lecitina:total de ácidos gordos), 24h, 50°C, sem adição de água. Nestas condições, aproximadamente 35% do total de ácidos gordos esterificados eram da família ω -3 (EPA, DPA ou DHA).

Senanayake & Shahidi (2007) modificaram óleo de foca (*Phoca groenlandica*) rico em PUFAs ω -3 por incorporação de ácido láurico (12:0), um ácido gordo saturado de cadeia média, facilmente absorvido através do tracto gastrointestinal e com funções anti-virais e anti-bacterianas entre outras. A reacção de acidólise foi catalisada por lipases de *Mucor miehei* e *Candida antarctica* e a incorporação de 12:0 foi de 29,7% ao fim de 24h.

2.8.4.5 Métodos Cromatográficos

É possível separar os ácidos gordos de acordo com o seu número de átomos de carbono e/ou de acordo com o seu grau de insaturação, utilizando suportes apropriados (Shahidi & Wanasundara, 1998). A cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) (Perrut, 1988; Shahidi & Wanasundara, 1998) e as resinas cromatográficas com prata (Adlof & Emken, 1985; Guil-Guerrero et al., 2003) têm sido utilizadas na preparação de concentrados de PUFAs ω -3.

HPLC

Embora a cromatografia gasosa esteja mais divulgada como técnica de análise de ácidos gordos, a cromatografia líquida de alta eficiência apresenta, em relação a ela, algumas vantagens: (i) permite analisar rapidamente compostos não-voláteis, iónicos e termicamente lábeis; (ii) pode-se fazer facilmente o *scale-up* a um nível preparativo; (iii) os componentes separados podem ser facilmente recolhidos e recuperados da fase móvel; (iv) estão disponíveis vários solventes e empacotamentos para colunas que permitem análises selectivas; (v) moléculas como triacilgliceróis, podem ser separadas e estudadas individualmente, (vi) ésteres oxidados e polimerizados, não detectados por cromatografia gás-líquido, podem ser detectados por refractometria em HPLC (Robles Medina et al., 1998).

A separação de ácidos gordos baseada em HPLC utiliza tipicamente a cromatografia de adsorção com nitrato de prata ou a cromatografia de partição de fase reversa.

HPLC com nitrato de prata

Os ésteres metílicos dos ácidos gordos de cadeia longa podem ser separados com base no número, posição e configuração geométrica das ligações duplas com uma coluna com nitrato de prata, ácido silícico (Scholfield, 1979) ou sílica impregnada com nitrato de prata (Özçimder & Hammers, 1980).

A HPLC de argentação é um método semi-preparativo que permite o fraccionamento rápido de ésteres de ácidos gordos com três a seis ligações duplas e que se baseia na formação de um complexo de transferência de carga entre o ião prata e as duplas ligações. Quanto maior for o número de ligações duplas, mais fortemente o ácido é retido e maior é o tempo de eluição (Robles Medina et al., 1998). Outra aplicação importante deste tipo de cromatografia é a separação de isómeros geométricos *cis* e *trans*. Os isómeros *trans* são eluídos antes dos isómeros *cis* correspondentes, devido aos menores efeitos estereoquímicos e ao facto das ligações duplas *cis* formarem complexos mais estáveis com o ião prata (Robles Medina et al., 1998).

Moffat et al. (1993) separaram triacilgliceróis ricos em PUFAs de óleo de sardinha por HPLC de argentação. A primeira região do cromatograma era constituída por triacilgliceróis contendo apenas ácidos gordos saturados e um, dois ou três ácidos monoénicos; a segunda região continha proporções crescentes de PUFAs incluindo EPA e DHA e a terceira região continha triacilgliceróis muito insaturados.

HPLC de fase reversa

Qualquer técnica cromatográfica em HPLC envolve a partição de um soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. A designação “fase reversa” significa que a fase móvel é mais polar que a fase estacionária (Christie, 2006).

As fases estacionárias mais utilizadas consistem em grupos octadecilsilil (“C18” ou “ODS”) ligados a uma superfície de silanol por ligações covalentes, embora fases em C8 tenham vindo a ganhar importância (Aveldano et al., 1983; Christie, 1989).

A separação dos ésteres dos ácidos gordos depende do tamanho de cadeia e do grau e tipo de insaturação (Robles Medina et al., 1998; Christie, 1998). O tempo de retenção aumenta com o aumento do tamanho de cadeia. Devido às interações entre a fase móvel (polar) e as duplas ligações os ácidos gordos ou ésteres com maior número de ligações duplas apresentam tempos de retenção menores (Robles Medina et al., 1998). Os isómeros *cis* e *trans* têm sido separados com sucesso utilizando HPLC de fase reversa devido ao impedimento estereoquímico eluente-ligação dupla em configuração *cis*. Os isómeros *cis* são eluídos primeiro que os correspondentes isómeros *trans* (Robles Medina et al., 1998).

Nas separações por fase reversa, os ácidos gordos livres separam-se mais rapidamente uma vez que são mais polares que os correspondentes ésteres (mais fortemente retidos). Assim, para separação de misturas complexas, a forma de ácidos gordos livres é preferível (Robles Medina et al., 1998).

A escolha do solvente para a separação dos ésteres de ácidos gordos depende da pureza pretendida para as fracções eluídas, da sua utilização final e das necessidades de produção (Shahidi & Wanasundara, 1998).

As fases móveis mais utilizadas são misturas metanol-água e acetonitrilo-água nas quais a proporção da fase orgânica varia de 60 a 100%. As separações com acetonitrilo demoram mais tempo e alguns ácidos gordos podem ser difíceis de dissolver neste solvente (Aveldano et al. 1983). Contudo, o acetonitrilo parece ser mais selectivo que o metanol e dá origem a picos mais finos, provavelmente devido à sua menor viscosidade. Atendendo à necessidade de utilizar solventes mais biocompatíveis podem utilizar-se misturas etanol-água, mas o fluxo deve ser menor que no caso das misturas metanol-água ou acetonitrilo-água (Robles Medina et al., 1998).

Os métodos de purificação baseados na cromatografia líquida de alta eficiência permitem atingir purezas elevadas (tabela13). Contudo, os rendimentos obtidos pela

Tabela 13 – Comparação das condições experimentais e purezas das fracções enriquecidas em PUFA obtidas por HPLC, descritas por vários autores.

| | Wille et al. (1987) | Traitler et al. (1988) | Traitler et al. (1988) | Cohen & Cohen (1991) | Robles Medina et al. (1995a) | Cartens et al. (1996) | Molina Grima et al. (1996) |
|----------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Fonte | | | | | | | |
| Concentrado | Oleo de peixe | Oleo de sementes | Oleo de sementes | <i>P. cruentum</i> | <i>I.galbana</i> | <i>P. tricornutum</i> | <i>P. tricornutum</i> |
| Amostra | Método ureia | Método ureia | Método ureia | Método ureia | Método ureia | Método ureia | Método ureia |
| Carga (g) | Esteres metílicos | Ácidos gordos | Ácidos gordos | Esteres metílicos | Ácidos gordos | Ácidos gordos | Ácidos gordos |
| SA (%) | 90 | 2 | 100 | 0,001 | 0,01 | 0,037 | 0,635 |
| EPA (%) | 7,2 | 16,6 | 16,6 | - | 22,6 | - | - |
| DHA (%) | 36,8 | - | - | 81,9 | 39,4 | 55,2 | 50,5 |
| GLA (%) | 40,9 | - | - | - | 23,4 | - | - |
| | - | 80,2 | 80,2 | - | - | - | - |
| Coluna | C18, reversa | C18, reversa | C18, reversa | C18, reversa ¹ | C18, reversa | C18, reversa | C18, reversa |
| Φ×L (cm) | 20×60 | 5,7×30 (2 | 20×60 | 1×25 | 1×25 | 1×25 | 4,7×30 |
| Tamanho de partícula (µm) | 5-100 | colunas) | 55-105 | 5 | 5 | 5 | 37-55 |
| Fase móvel | Metanol-água | Metanol-água | Metanol-água | Acetonitrilo-água | Metanol-água | Metanol-água | Metanol-água |
| Composição | 90:10 (m/m) | 90:10(m/m) | 90:10(m/m) | Gradiente | 80:20 (m/m) | 80:20 (m/m) | 80:20 (m/m) |
| Fluxo (mL/min) | 1200 | 150 | 2000 | 5 | 3 | 3 | 66 |
| Separação (min) | 50 | 20 | 20 | | 70 | 90 | 60 |
| Detector | Índice refracção | Índice refracção | Índice refracção | GC ² | UV a 217 nm | UV a 217 nm | UV a 217 nm |
| Fracções | | | | | | | |
| SA (%) | 93,1 | 46,3 | 78,3 | - | 94,8 (100%) ³ | 93,4 (85%) ³ | 95,68(97,3%) ³ |
| EPA (%) | 85,6 | - | - | 97,3 | 96,0 (99,6%) ³ | - | - |
| DHA (%) | 83,1 | - | - | - | 94,9 (94,0%) ³ | - | - |
| GLA (%) | - | 95,4 | 95,7 | - | - | - | - |

¹ eluição à pressão atmosférica;

² Cromatografia gás-líquido;

³ os valores entre parêntesis correspondem ao rendimento de HPLC.

maioria dos autores são baixos. A obtenção de baixos rendimentos é problemática sobretudo porque os concentrados de PUFAs são obtidos a partir de fontes dispendiosas.

Cromatografia de coluna aberta

A cromatografia em coluna de ácido silícico é um método rápido de separação de triacilgliceróis e é aplicável a preparações em grande escala (Hayashi & Kishimura, 1993).

A técnica tem sido utilizada para separar triacilgliceróis a partir de um extracto lipídico bruto, de acordo com as diferenças de insaturação (Robles Medina et al., 1998). Triacilgliceróis ricos em EPA foram obtidos a partir de vieiras (*Patinopecten yessoensis*), sardinhas (*Sardinops melanosticta*) e lulas (*Todarodes pacificus*) utilizando esta técnica e 5% de éter dietílico em hexano (v/v) como eluente (Hayashi & Kishimura, 1993). Os autores obtiveram cinco a seis fracções em que a última apresentava teores elevados de EPA (47,1- 57,7% no caso das vieiras e 31,8-39,7% no caso das sardinhas e das lulas).

A cromatografia de fase reversa em coluna aberta é mais barata que a HPLC de fase reversa (Robles Medina et al., 1998). Cohen & Cohen (1991) obtiveram EPA com uma pureza superior a 93% a partir de uma mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos da fracção dos glicolípidos de *Porphyridium cruentum*; quando a aplicação da cromatografia de fase reversa foi precedida de um tratamento com ureia 85% do EPA foi recuperado com uma pureza de 97,3%

A cromatografia em coluna aberta tem, no entanto, a desvantagem de consumir grandes quantidades de solventes de HPLC (Robles Medina et al., 1998), de elevadíssimo grau de pureza, e, por isso, de custo muito elevado.

Cromatografia de camada fina

Trata-se de uma excelente ferramenta para a análise qualitativa dos componentes presentes nos óleos marinhos mas que é extremamente morosa quando utilizada para a quantificação desses componentes (Borch-Jensen & Mollerup, 1996).

Shanta & Ackman (1991) descreveram um método cromatográfico de camada fina, exequível e barato, para a concentração de PUFAs de cadeia longa obtidos a partir de alimentos e lípidos marinhos e demonstraram a separação preferencial dos ésteres metílicos de C20 e C22 dos saturados, monoinsaturados e diinsaturados de cadeia mais curta.

Nakamura et al. (1996) utilizaram a cromatografia de camada fina para separar os PUFAs e estimar o seu teor nos lípidos de organismos aquáticos. Utilizaram placas comerciais de sílica gel e *n*-hexano/éter etílico/ácido acético (95:5:1 v/v) como solvente.

A cromatografia de camada fina é mais um método analítico; são necessárias muitas placas para obter quantidades apreciáveis de PUFAs purificados por esta técnica (Robles Medina et al., 1998).

Cromatografia com fluidos supercríticos

Os ésteres etílicos dos ácidos gordos são solúveis, para concentrações até 10% em massa, em CO₂ a 230 bar e 80°C e, por isso, a cromatografia com CO₂ supercrítico constitui um método atractivo para produzir ésteres de EPA e DHA de elevada pureza utilizando um eluente que não é tóxico nem inflamável (Alkio et al., 2000). A utilização de um eluente supercrítico permite também aumentar a velocidade de separação e assim, utilizar equipamento mais compacto, comparativamente com a utilização de eluentes líquidos (Alkio et al., 2000).

O CO₂ supercrítico é um eluente não polar que pode ser utilizado com fases estacionárias como a sílica. Contudo, devido à reduzida polaridade dos ésteres dos ácidos gordos, a retenção em sílica é fraca e conduz a separações parciais entre os ésteres de EPA e DHA (Alkio et al., 2000). Fases reversas tais como octadecilsilano (ODS) melhoram a resolução dos ésteres dos ácidos gordos e foram utilizadas na separação dos ésteres dos ácidos gordos do óleo de atum. Alkio et al. (2000) obtiveram concentrados de ésteres de DHA com purezas superiores a 95% num único passo cromatográfico utilizando CO₂ como fase móvel a 65°C e 145 bar e uma fase estacionária de fase reversa do tipo sílica-octadecilsilano.

Berger et al. (1988) separaram ésteres metílicos de ácidos gordos ω -3 utilizando cromatografia de fase reversa C18-sílica e CO₂ como eluente. Partindo de um concentrado com 14,8 % (m/m) de EPA e 73% (m/m) de DHA, obtiveram três fracções com concentrações EPA/DHA (em percentagem mássica) de 54,8/26,7; 2,7/78,0 e 18,7/78,8.

Pettinello et al. (2000) fraccionaram uma mistura contendo 68% de ésteres etílicos de EPA obtidos a partir de óleo de peixe numa coluna de adsorção utilizando CO₂ como solvente supercrítico. À escala laboratorial obtiveram 95% de ésteres etílicos de EPA com um rendimento de 11% (m/m) e verificaram que a pureza descia para 90%

para rendimentos de 43%. À escala piloto, obtiveram uma pureza de 93% e um rendimento de 24,6%.

2.8.4. 6 Métodos baseados na solubilidade de sais

A solubilidade dos sais dos ácidos gordos em solventes orgânicos depende da natureza do ião metálico, do comprimento da cadeia do ácido gordo, do número de ligações duplas do ácido gordo, da temperatura, ente outros factores (Robles Medina et al., 1998).

O método mais utilizado baseia-se na solubilidade dos sais de lítio em acetona e álcool. Os sais de lítio dos ácidos gordos poli-insaturados são solúveis em 95% de acetona enquanto os sais dos ácidos gordos menos insaturados são insolúveis e podem ser separados (Robles Medina et al., 1998).

Os sais de sódio dos ácidos gordos podem ser separados atendendo às diferenças das respectivas solubilidades em etanol. O processo baseia-se na diferença de solubilidade dos sais de sódio de ácidos gordos em etanol à temperatura ambiente. Quanto maior for o número de ligações duplas, e menor for o comprimento de cadeia para o mesmo grau de insaturação, maior é a solubilidade de um determinado ácido gordo (Guil-Guerrero et al., 2007). Utilizando este método Guil-Guerrero et al. (2007) obtiveram 17,8% de pureza e 77,6% de rendimento em EPA e 33,3 e 82,2% para a pureza e rendimento em DHA a partir do óleo de fígado de tubarão (*Isurus oxyrinchus*). De acordo com os autores o processo é rápido e versátil, facilmente adaptável à concentração de PUFAs de óleos de peixe com perfis de ácidos gordos distintos tendo sido testado um aumento de escala (300 vezes) no qual o teor e o rendimento em EPA e DHA foram similares aos obtidos à escala analítica. O método constitui uma alternativa aos métodos de inclusão de ureia (de eficiência comparável) com vantagens em termos de segurança e bio-compatibilidade (Guil-Guerrero et al., 2007).

Chen & Ju (2000) utilizaram as diferenças de solubilidade dos sais dos ácidos gordos em solvente para concentrar em EPA e DHA os ácidos gordos livres obtidos por saponificação de óleo de *menhaden* (*Brevoortia*). Obtiveram 64% (m/m) de EPA e DHA e um rendimento de 41,5% utilizando um volume total de 112 mL constituído por 88,1% de acetona, 10,0% de ácidos gordos livres e 1,85% NaOH 15N à temperatura de 30°C, durante 1h.

Rubin (2004) patenteou um processo que permite obter EPA e DHA puros a partir de uma mistura enriquecida nos dois, obtida a partir de óleo de peixe. Os ácidos gordos são separados recorrendo à formação de sais de magnésio em acetona. Como o sal de magnésio do DHA é muito mais solúvel em acetona que o correspondente sal de EPA, a separação torna-se possível. Arrefecendo a solução contendo os dois sais, o sal de EPA precipita e pode ser separado. Acidificando a solução de cada um dos sais obtém-se o ácido gordo correspondente.

Quando uma solução saponificada é arrefecida, os sais alcalinos dos ácidos gordos menos insaturados cristalizam mais rapidamente que os sais dos ácidos gordos mais insaturados (contendo quatro ou mais ligações duplas). O método permitiu concentrar o EPA e o DHA presentes no óleo da sardinha em 2,3 vezes. Comparando a composição em ácidos gordos dos concentrados obtidos a partir dos sais alcalinos de óleo de sardinha a diferentes temperaturas de cristalização e taxas de arrefecimento, verificou-se que estes factores tinham pouca influência quer no teor de EPA e DHA, quer no rendimento obtido. Com base nestes resultados, a utilização de temperaturas próximas da temperatura ambiente constitui uma escolha óbvia para a produção de concentrados de PUFAs ω -3 em grande escala (Shahidi & Wanasundara, 1998).

2.8.4.7 Destilação

A destilação é um processo de separação de misturas líquidas que se baseia nas diferenças nos pontos de fusão e massa molecular dos ácidos gordos sob pressão reduzida (Shahidi & Wanasundara, 1998).

Geralmente utiliza-se a destilação fraccionada dos ésteres metílicos a pressões reduzidas (0,1-1,0 mmHg) mas, mesmo nestas condições, são necessárias temperaturas relativamente elevadas que tornam os ácidos gordos mais insaturados, sobretudo os PUFAs ω -3, mais susceptíveis à oxidação, polimerização e isomerização de duplas ligações (Shahidi & Wanasundara, 1998; Wanasundara et al., 2002).

2.8.4.8 Separação por iodolactonização

O método baseia-se no princípio de que a taxa de formação da iodo γ -lactona derivada do DHA, é significativamente superior à da formação da δ -lactona derivada do EPA (Robles Medina et al., 1998) e permite separar o DHA e o EPA de uma mistura de ácidos gordos.

Wright et al. (1987) e Corey & Wright (1988) descreveram um procedimento que permite isolar DHA e EPA a partir de óleo de fígado de bacalhau. O processo envolve: (i) saponificação e extracção dos compostos neutros e da matéria insaponificável; (ii) remoção dos ácidos gordos saturados e monoinsaturados por precipitação dos respectivos sais de lítio em acetona; (iii) iodolactonização em tetrahydrofurano utilizando iodo e iodeto de potássio para formação da iodo γ -lactona derivada do DHA e da δ -lactona derivada do EPA; (iv) extracção da γ -lactona como produto neutro. A γ -lactona é depois tratada com iodotrimetilsilano para obter o ácido pretendido. O EPA pode, posteriormente, ser separado a partir da mistura residual. Isso requer a redução selectiva da δ -lactona derivada do EPA na presença de iodo γ -lactona para obter EPA puro a partir do concentrado de ácidos gordos. A acidificação e extracção dos ácidos gordos que não reagiram dá origem a uma mistura de PUFAs enriquecida em EPA. Esta mistura é sujeita a iodolactonização em tetrahydrofurano utilizando iodo e iodeto de potássio em excesso. Obtém-se uma mistura de iodolactonas derivadas do EPA e do DHA residual. A mistura é tratada com iodotrimetilsilano sendo a δ -lactona derivada do EPA preferencialmente clivada, dada a maior estabilidade da γ -lactona. Após reacção da maior parte da δ -lactona a mistura é tratada de forma a obter EPA puro (Wright et al., 1987; Corey & Wright, 1988).

2.9 Referências

Abbadì, A., Domergue, F., Bauer, J., Napier, J.A., Welti, R., Zähringer, U., Cirpus, P. and Heinz E. (2004). Biosynthesis of Very-Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Transgenic Oilseeds: Constraints on Their Accumulation. *Plant Cell* 16: 2734-2748.

Abbadi, A., Domergue, F., Meyer, A., Riedel, K., Sperling, P., Zank, T.K. and Heinz, E. (2001). Transgenic oilseeds as sustainable source of nutritionally relevant C20 and C22 polyunsaturated fatty acids? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103:106-113.

Abril, J.R., Barclay, W.R., Mordenti, A., Tassinari, M. and Zotti, A. (2008). Methods of incorporating polyunsaturated fatty acids in milk. US Patent 2008/0020086 A1.

Abu-Nasr, A.M., Potts, W.M. and Holman, R. T. (1954). Highly Unsaturated Fatty Acids. II. Fractionation by Urea Inclusion Compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 31:16-20.

Ackman, R.G., Ratnayake, W.M.N. and Olsson, B. (1988). The "Basic" Fatty Acid Composition of Atlantic Fish Oils: Potential Similarities Useful for Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids by Urea Complexation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65(1):136-138.

Adlof, R.O. and Emken, E.A. (1985). The Isolation of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Methyl Esters of Fish Oils by Silver Resin Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66(11):1592-1595.

Adlof, R.O., Copes, L.C. and Emken, E.A. (1995). Analysis of the Monoenoic Fatty Acid Distribution in Hydrogenated Vegetable Oils by Silver-Ion High-performance Liquid Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (5):571-574.

Akoh, C.C., Jennings, B.H. and Lillard, D.A. (1995). Enzymatic Modification of Trilinolein: Incorporation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72(11):1317-1321.

Akoh, C.C., Jennings, B.H. and Lillard, D.A. (1996). Enzymatic Modification of Evening Primrose Oil: Incorporation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(8):1059-1062.

Albergaria, H., Roseiro, J.C. and Amaral-Collaco, M.T. (1999). Technological aspects and kinetic analysis of microbial gum production on carob. *Agro Food Ind. Hi Tec.* 10:24-26.

Albert, C.M., Hennekens, C.H., O'Donnell, C. J., Ajani, U.A., Carey, V. J., Willett, W.C., Ruskin, J.N. and Manson, J.E. (1998). Fish Consumption and Risk of Sudden Cardiac Death. *JAMA* 279(1):23-28.

Albert, C.M., Campos, H., Stampfer, M.J., Ridker, P.M., Masson, J.E., Willett, W.C. and Ma, J. (2002). Blood Levels of Long-Chain n-3 Fatty Acids and the Risk of Sudden Death. *N. Engl. J. Med.* 346(15):1113-1118.

Alkio, M., Gonzalez, C., Jäntti, M. and Aaltonen, O. (2000). Purification of Polyunsaturated Fatty Acid Esters from Tuna Oil with Supercritical Fluid Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77(3):315-321.

Amaral, P.F.F., Freire, M.G., Rocha-Leão, M.H.M., Marrucho, I.M., Coutinho, J.A.P. and Coelho, M.A.Z. (2008). Optimization of Oxygen Mass Transfer in a Multiphase Bioreactor With Perfluorodecalin as a Second Liquid Phase. *Biotechnol. Bioeng.* 99(3):588-598.

Anbu, P., Kim, D.-U., Jeh, E.-J., Jeong, Y.-S. and Hur B.-K. (2007). Investigation of Physiological Properties and Synthesis of PUFAs from *Thaustochytrids* and its Electrophoretic Karyotypes. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12:720-729.

Apt, K. (2003). Commercial Production of DHA from Dinoflagellates, 94th AOCS Annual Meeting & Expo, May 4-7, Kansas City, Missouri, USA.

Apt, K.E. and Behrens, P.W. (1999). Commercial Developments in Microalgal Biotechnology. *J. Phycol.* 35:215-226.

Aquafauna Bio-Marine (2008). www.aquafauna.com/Diets&Feeds.htm (consultado em 1 Novembro 2009).

Arruda, P.V., Rodrigues, R.C.L.B. and Felipe, M.G.A. (2007). Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analytica* 26:56-62.

Arterburn, L.M., Boswell, K.D., Koskelo, E-K., Kassner, S.L., Kelly, C. and Kyle, D.J. (2000). A combined subchronic (90-day) toxicity and neurotoxicity study of single-cell source of docosahexaenoic acid triglyceride (DHASCO[®] oil). *Food Chem. Toxicol.* 38:35-49.

Arts, M.T., Ackman, R.G. and Holub, B.J. (2001). "Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 58:122-137.

Asturias, F.J. (2006). Mammalian Fatty Acid Synthase: X- ray Structure of a Molecular assembly Line. *ACS Chem. Biol.* 1(3):135-138.

Australia New Zealand Food Authority (2002). Proposal P93- Review of infant formula, Supplementary final assessment (Inquiry- s.24) report.

Aveldano, M.I., VanRollins, M. and Horrocks, L.A. (1983). Separation and quantification of free fatty acids and fatty acid methyl esters by reverse phase high pressure liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 24:83-92.

Bailey, R.B., DiMasi, D., Hansen, J.M., Mirrasoul, P.J., Ruecker, C.M., Kaneko, T. and Barclay, W. (2008). Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acid by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors. US Patent 2008/0057551 A1.

Bajpai, P. and Bajpai, P.K. (1993). Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J. Biotechnol.* 30:161-183.

Bajpai, P., Bajpai, P.K. and Ward, O.P. (1991a). Production of docosahexaenoic acid *Thraustochytrium aureum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:706-710.

Bajpai, P.K., Bajpai, P. and Ward, O.P. (1991b). Optimization of Production of Docosahexaenoic Acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68(7):509-514.

Bang, H.O., Dyerberg, J. and Hjøorne, N. (1976). The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med. Scand.* 200(1-2):69-73.

Barber, M.D., Ross, J.A., Preston, T., Shenkin, A. and Fearon, K.C.H. (1999). Fish Oil-Enriched Nutritional Supplement Attenuates Progression of the Acute-Phase Response in Weight-Losing Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *J. Nutr.* 129:1120-1125.

Barberger-Gateau, P., Letenner, L., Deschamps, V., Pérès, K., Dartigues, J.-F. and Renaud, S. (2002). Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *Br. Med. J.* 325:932-933.

Barbier, M., Albert, M., Géraud, M.-L., Bhaud, Y., Picard, A. and Soyer-Gobilard, M.-O. (1995). Cell cycle regulation of primitive dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Biecheler: Evidence for the presence of an homolog of cyclin B. *Biol. Cell* 84:35-42.

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

Barclay, W., Weaver, C. and Metz, J. (2005). Development of a Docosahexaenoic Acid Production Technology Using *Schizochytrium*: a Historical perspective in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp. 36-52.

Barclay, W.R. (1992). Process for the heterotrophic production of microbial products with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids. US Patent 5,130,242.

Barclay, W.R. (1994). Process for growing *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* using non-chloride salts to produce a microfloral biomass having omega-3 highly unsaturated fatty acids. US Patent 5,340,742.

Barclay, W.R. and Zeller, S. (1996). Nutritional Enhancement of n-3 and n-6 Fatty Acids in Rotifers and *Artemia* nauplii by Feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J. World Aquacult. Soc.* 27(3):314-322.

Barclay, W.R., Meager, K.M. and Abril, J.R. (1994). Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 6:123-129.

Bartee, S.D., Kim, H.J. and Min, D.B. (2007). Effects of Antioxidants on Oxidative Stability of Oils Containing Arachidonic, Docosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84(4):363-368.

Bartsch, H., Nair, J. and Owen, R.W. (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20(12):2209-2218.

Basheer, S. Mogi, K. and Nakajuma, M. (1995). Interesterification Kinetics of Triglycerides and Fatty Acids with Modified Lipase in n-Hexane. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72(5):511-518.

Bates, D., Cartlidge, N.E.F., French, J.M., Jackson, M.J., Nightingale, S., Shaw, D.A., Smith, S., Woo, E., Hawkins, S.A., Millar, J.H.D., Belin, J., Conroy, D.M., Gill, S.K., Sidey, M., Smith, A.D., Thompson, R.H.S., Zilkha, K., Gales, M., Sinclair, H.M. (1989). A double-blind controlled trial of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in treatment of multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 52:18-22.

Beach, D.H. and Holz, G.G. (1973). Environmental influences on the docosahexaenoate content of the triacylglycerols and phosphatidylcholine of a heterotrophic, marine dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*. *Biochim. Biophys. Acta* 316:56-65.

Beach, D.H., Harrington, G.W., L'Gellerman, J., Schlenk, H. and Holz, G.G. (1974). Biosynthesis of oleic acid and docosahexaenoic acid by a heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Biochim. Biophys. Acta* 369:16-24.

Beam, C.A. and Himes, M. (1974). Evidence for sexual fusion and recombination in the dinoflagellate *Cryptothecodinium (Gyrodinium) cohnii*. *Nature* 250:435-436.

Beam, C.A and Himes, M. (1980). Utilization of carbon sources by different strains of *Cryptothecodinium cohnii* Seligo. *J. Protozool.* 27:A37.

Beam, C.A. and Himes, M. (1977). Sexual Isolation and Genetic Diversification Among Some Strains of *Cryptothecodinium cohnii*-like Dinoflagellates Evidence of Speciation. *J. Protozool.* 24(4):532-539.

Beam, C.A., and Himes, M. (1982). Distribution of Members of the *Cryptothecodinium cohnii* (Dinophyceae) Species Complex. *J. Protozool.* 29(1):8-15.

Beam, C.A., and Himes, M. (1987). Electrophoretic Characterization of Members of the *Cryptothecodinium cohnii* (Dinophyceae) Species Complex. *J. Protozool.* 34(2):204-217.

Behrens, P.W., Thompson, J.M., Apt, K., Pfeifer, J.W., Wynn, J.P., Lipp-Meier, J.C., Fichtali, J. and Hansen, J. (2005). Production of high levels of DHA in microalgae using modified amounts of chloride and potassium. WO 2005/035775 A1.

Belarbi, H., Molina, E. and Chisti, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microb. Technol.* 26:516-529.

Bell, J.G., Tocher, D.R., Farndale, B.M., Cox, D.I., McKinney, R.W. and Sargent, J.R. (1997). The Effect of Dietary Lipid on Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Undergoing Parr-Smolt Transformation. *Lipids* 32(5):515-525.

Bell, M.V. and Henderson, R.J. (1990). Molecular species Composition of Phosphatidylcholine from *Cryptothecodinium cohnii* in relation to Growth Temperature. *Lipids* 25(2):115-118.

Belluzi, A., Boschi, S., Brignola, C., Munarini, A., Cariani, G. and Miglio, F. (2000). Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (suppl):339S-342S.

Benatti, P., Peluso, G., Nicolai, R. and Calvani, M. (2004). Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *J. Am. Coll. Nutr.* 23(4):281-302.

Bérard, A.M., Dumon, M.-F. and Darmon, M. (2004). Dietary fish oil up-regulates cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA in mouse liver leading to an increase in bile acid and cholesterol excretion. *FEBS Lett.* 559:125-128.

Bergé, J.P. and Barnathan, G. (2005). Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 96:49-125.

Berger, C. Jusforgues, P. and Perrut, M. (1988). Purification of unsaturated fatty acid esters by preparative supercritical fluid chromatography in: *Proceedings of 1st International Symposium on Supercritical Fluids*, October 17-19, Nice, France, pp.397-404.

Bernardo-Gil, M.G., Ribeiro, M.A. and Esquivel, M.M. (2002). Produção de extractos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia* 73:14-21.

Bhaud, Y., Barbier, M. Soyer-Gobillard, M.-O. (1994). A Detailed Study of the Complex Cell Cycle of the Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* Biecheler and Evidence for Variation in Histone H1 Kinase Activity. *J. Euk. Microbiol.* 41(5):519-526.

Bhaud, Y., Guillebault, D., Lennon, J.F., Defacque, H., Soyer-Gobillard, M.O. and Moreau H. (2000). Morphology and behaviour of dinoflagellate chromosomes during the cell cycle and mitosis. *J. Cell Sci.* 113:1231-1239.

Bhaud, Y., Salmon, J.-M., Lennon, J.F. and Soyer-Gobillard, M.-O. (1991). The complex cell cycle of the dinoflagellate protoctist *Cryptothecodinium cohnii* as studied *in vivo* and by cytofluorimetry. *J. Cell Sci.* 100:675-682.

Bhaud, Y., Soyer-Gobillard, M.-O. and Salmon, J.M. (1988). Transmission of gametic nuclei through a fertilization tube during mating in a primitive dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. *J. Cell Sci.* 89:197-206.

Biecheler, B. (1952). Recherches sur les Péridiniens. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 36:S1-S149.

Birch, E.E., Castañeda, Y.S., Wheaton, D.H, Birch, D.G., Uauy, R.D. and Hoffman, D.R. (2005). Visual maturation of term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented or control formula for 12 mo. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:871-879.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.

Bongiorni, L., Jain, R., Raghukumar, S. and Aggarwal, R.K. (2005). *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a New thaustochytrid Stramenopilan Protist from Mangroves of Goa, India. *Protist* 156:303-315.

Borch-Jensen, C. and Mollerup, J. (1996). Supercritical Fluid Chromagrophy of Fish, Shark and Seal Oils. *Chromatographia* 42 (5/6):252-258.

Borowitzka, M.A. (1995). Patents. *J. Appl. Phycol.* 7:509-520.

Borowitzka, M.A. (1995). Comercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermentors. *J. Biotechnol.* 70:313-321.

Boswell, K., Koskelo, E.-K., Carl, L., Glaza, S., Hensen, D.J., Williams, K.D. and Kyle, D.J. (1996). Preclinical Evaluation of Single Cell Oils that are Highly Enriched with Arachidonic Acid and Docosahexaenoic Acid. *Food Chem. Toxicol.* 34:585-593.

Bottino, N.R., Vandenburg, G.A. and Reiser, R. (1967). Resistance of Certain Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Oils to Pancreatic Lipase Hydrolysis, *Lipids* 2(6):489-493.

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

Brenna, J.T., Varamini, B., Jensen, R.G. Diersen-Schade, D.A., Boettcher, J.A. and Arterburn, L.M. (2007). Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *Am. J. Clin. Nutr.* 85:1457-64.

Brossard, N., Croset, M., Pachiaudi, C., Riou, J.P., Tayot, J.L., and Lagarde, M. (1996). Retroconversion and metabolism of [¹³C]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [¹³C]22:6n-3- triacylglycerols. *Am. J. Clin. Nutr.* 64:577-586.

Burdge, G. (2004). α -Linolenic acid metabolism in men and woman: nutritional and biological implications. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7(2):137-144.

Burdge, G.C. (2006). Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75(3):161-168.

Burdge, G.C. and Calder P.C. (2005). Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.* 45(5):581-97.

Burdge, G.C., Sherman, R.C., Ali, Z., Wootton, S.A. and Jackson, A.A. (2006). Docosahexaenoic acid is selectively enriched in plasma phospholipids during pregnancy in Trinidadian woman - Results of a pilot study. *Reprod. Nutr. Dev.* 46:63-67.

Burgess, J.R., Stevens, L., Zhang, W. and Peck, L. (2000). Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(suppl):327S-330S.

Burja, A.M., Radianingtyas, H., Windust, A. and Barrow, C.J. (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.

Burr, M.L. (2001). Reflections on the Diet and Reinfarction Trial (DART). *Eur. Heart J. Suppl.*3 (supplement D):D75-D78.

Burr, M.L., Fehily, A.M., Gilbert, J.F., Rogers, S., Holliday, R.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C. and Deadman, N.M. (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 2(8666):757-761.

Calder, P.C. (2004). n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clinical Science*, 107:1-11.

Calder, P.C. (2006). Long-chain polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Scand. J. Food Nutr.* 50(S2):54-61.

Calder, P.C. (2008). Controversies in clinical nutrition: omega-3 fatty acids in parenteral nutrition. *Nutr. Ther. Metabol.* 26(1):15-22.

Calder, P.C. and Grimble, R.F. (2002). Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56(3):S14-S19.

Calixto, F.S. and Cañellas, J. (1982). Components of Nutritional Interest in Carob Pods (*Ceratonia Siliqua*). *J. Sci. Food Agric.* 33:1319-1323.

Campos, L.S. (2002). Lípidos – estruturas e metabolismo. Interrelações metabólicas in: *Entender a Bioquímica*, Escolar Editora, Lisboa, Portugal, pp.351-422.

Canas, B.J. (1999). Ethyl Carbamate Formation During Urea Complexation for Fractionation of Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76(4):537.

Cannon, P.J. (1984). Eicosanoids and the blood vessel wall. *Circulation* 70(4):523-528.

Carlson, S.E., Cooke, R.J., Werkman, S.H. and Tolley E.A. (1992). First year growth of preterm infants fed standard compared to marine oil n-3 supplemented formula. *Lipids.* 27(11):901-907.

Carlson, S.E., Werkman, S.H., Peeples, J.M., Cooke, R.J. and Tolley, E.A. (1993). Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1073-1077.

Cartens, M., Molina Grima, E., Robles Medina, A., Giménez Giménez, A. and Ibáñez González, J. (1996). Eicosapentaenoic Acid (20:5n-3) from the Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(8):1025-1031.

Carvalho, P.O., Campos, P.R.B., Noffs, M.A., Bastos, D.H.M and Oliveira, J.G. (2002). Enzymic Enhancement of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids Content in Brazilian Sardine Oil. *Acta Farm. Bonaerense* 21(2):85-88.

Carvalho, P.O., Campos, P.R.B., Noffs, M.A., Oliveira, J.G. Shimizu, M.T. and Silva, D.M. (2003). Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quím. Nova* 26(1):75-80.

Cascaval, D., Galaction, A.-I., Folescu, E. and Turnea, M. (2006). Comparative study on the effects of n-dodecane addition on oxygen transfer in stirred bioreactors for simulated, bacterial and yeast broths. *Biochem. Eng. J.* 31(1):56-66.

Céron García, M.C., Sánchez Mirón, A., Fernandez Sevilla, J.M., Molina Grima, E. and García Camacho, F. (2005). Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochem.* 40:297-305.

Certik, M. and Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acid Production. *J. Biosci. Bioeng.* 87(1):1-14.

Chakraborty, K. and Raj, R.P. (2007). Eicosapentaenoic Acid Enrichment from Sardine Oil by Argentation Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 55(18):7586-7595.

Chatton, E. (1952). Classe des Diniflagellates ou Péridiens in: Grasse P.P. (ed) *Traité de Zoologie*, vol 1, part 1, Masson, Paris, pp.309-406.

Chavarro, J.E., Stampfer, M.J., Li, H., Campos, H., Kurth, T. and Ma, J. (2007). A Prospective Study of Polyunsaturated Fatty Acid Levels in Blood and Prostate Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(7):1364-1370.

Chemler, J.A., Yan, Y. and Koffas, A.G. (2006). Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fac.* 5:20

Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *TIBTECH* 14:421-426.

Chen, F. and Johns, M.R. (1991). Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *J. Appl. Phycol.* 3:203-209.

Chen, F. and Johns, M.R. (1995). A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. *Journal of Applied Phycology* 7:43-46.

Chen, G.-Q. and Chen, F. (2006). Growing phototrophic cells without light. *Biotechnol. Lett.* 28:607-616.

Chen, H.C. and Chen, M.I. (1999). Heterotrophic production of DHA by *Schizochytrium* and *Traustochytrium* fungal species. *The IFT Annual Meeting* 22A-8.

Chen, T.-C. and Ju, Y.-H. (2000). Enrichment of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid in Saponified Menhaden Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77(4):425-428.

Chen, T.-C. and Ju, Y.-H. (2001). Polyunsaturated Fatty Acid Concentrates from Borage and Linseed Oil Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78(5):485-488.

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

Chin, H.J., Shen, T.F., Su, H.P. and Ding, S.T. (2006). *Schizochytrium limacinum* SR-21 as source of docosahexaenoic acid: optimal growth and use as a dietary supplement for laying hens. *Aust. J. Agric. Res.* 57:13-20.

Chisti, Y. (1998). Strategies in Downstream Processing in: *Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook*, vol. 2 (Subramanian, G., editor), Wiley-VCH, New York, pp.3-30.

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

Chisti, Y. and Moo-Young, M. (1994). Separation Techniques in Industrial bioprocessing in: *Bioproducts processing: technologies for the tropics* (Hashim, M.A), IchemE, UK, pp.135-146.

Christie, W.W. (1998). Some recent advances in the chromatographic analysis of lipids. *Analisis Magazine* 26(3):M34-M39.

Christie, W.W. (2006). Gas Chromatography and lipids. www.lipidlibrary.co.uk (consultado em 1 de Outubro de 2009).

Christie, W.W. (2009a). Fatty acids: methylene-interrupted double bonds - structures, occurrence and biochemistry. www.lipidlibrary.co.uk (consultado em 1 de Outubro de 2009).

Christie, W.W. (2009b). Fatty acids: methylene-interrupted double bounds. Structures, Occurrence and Biochemistry. http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/fa_poly/index.htm (consultado em 25 de Outubro de 2009).

Clandini, M.T., Chappell, J.E., Leong, S., Heim, T., Swyer, P.R. and Chance G.W. (1980). Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acids requirements. *Early Hum. Dev.* 4(2):121-129.

Clough, P. (2001). Sources and production of speciality oils containing GLA and stearidonic acid. *Lipid Technol.* 13:9-12.

Clowes, C. (2003). Dinoflagellata (Dinoflagellata).

<http://www.palaeos.com/Eukarya/Units/Alveolata/Dinoflagellata.000.html>. (consultado em 25 de Outubro de 2009).

Cobelas, M.A. (1989). Lipids in Microalgae. A review II. Environment. *Grasas Aceites* 40(3):213-223.

Cohen Z. and Heimer, Y. M. (1992). Production of Polyunsaturated Fatty Acids (EPA, ARA and GLA) by the Microalgae *Porphyridium* and *Spirulina* in: *Industrial Applications of Single Cell Oils*. Kyle D. J. & Ratledge C. (eds.), AOCS, Champaign, pp. 243-273.

Cohen, Z. and Cohen, S. (1991). Preparation of Eicosapentaenoic Acid (EPA) Concentrate from *Porphyridium cruentum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68(1):16-19.

Colter, A.L., Cutler, C. and Meckling, K.A. (2008). Fatty acid status and behavioural symptoms of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in adolescents: a case-control study. *Nutr. J.* 7:8 doi:10.1186/1475-2891-7-8.

Connor, W. E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(suppl):171S-175S.

Connor, W.E. and Connor, S.L. (2007). The importance of fish and docosahexaenoic acid in Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 929-930.

Corey, E.J., and Wright, S.W. (1988). Convenient method for the recovery of eicosapentaenoic acid from cod liver oil. *J. Org. Chem.* 53:5980-5981.

Craig, S. and Helfrich, L.A. (2002). Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding. *Virginia Cooperative Extension*. Publication 420-256.

Craig-Schmidt, M.C. and Huang, M.-C. (1998). Interaction of n-6 and n-3 fatty acids: Implication for Supplementation of Infant Formula with Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in: *Lipids in Infant Nutrition*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp.63-84.

Crawford, M.A. (2000). Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(suppl):275S-284S.

Cunnane, S.C. (2000). The conditional nature of the dietary need for polyunsaturates: a proposal to reclassify "essential fatty acids" as "conditionally-indispensable" or "conditionally-dispensable" fatty acids. *Brit. J. Nutr.* 84:803-812.

Cunnane, S.C. (2003). Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm? *Prog. Lipid Res.* 42:544-568.

D'Almeida, A., Carter, J.P., Anatol, A. and Prost C. (1992). Effects of a combination of evening primrose oil (gamma linolenic acid) and fish oil (eicosapentaenoic + docosahexaenoic acid) versus magnesium, and versus placebo in preventing pre-eclampsia. *Women Health.* 19(2-3):117-131.

Dangour, A.D. and Uauy, R. (2008). n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for optimal function during brain development and ageing. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17(S1):185-188.

de Moura, J.M.L.N., Ribeiro, A.P.B., Grimaldi, R. and Gonçalves, L.A.G. (2007). Reator de membrana enzimático e fluidos supercríticos: Associação de Processos. *Quím. Nova* 30(4):965-969.

de Swaaf, M. E., de Rijk T. C., Eggink, G., and Sijtsma L. (1999). Optimization of Docosahexaenoic Acid Production in Batch Cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *J. Biotechnol.* 70:185-192.

de Swaaf, M. E., Grobben, G. J., Eggink, G, Rijk T. C., Meer, P. and Sijtsma, L. (2001). Characterisation of extracellular polysaccharides produced by *Cryptocodinium cohnii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 395-400.

de Swaaf, M. E., Rijk, T. C., Meer P., Eggink, G. and Sijtsma, L. (2003a). Analysis of docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by ¹³C labelling and desaturase inhibitor experiments. *J. Biotechnol.* 103:21-29.

de Swaaf, M.E. Pronk, J.T. and Sijtsma L. (2003 b). Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:40-43.

de Swaaf, M. E., Sijtsma, L. and Pronk J. T. (2003 c). High-Cell-Density Fed-Batch Cultivation of the Docosahexaenoic Acid Producing Marine Alga *Cryptocodinium cohnii*. *Biotechnol. Bioeng.* 86(6):666-672.

de Swaaf, M.E. (2003). Docosahexaenoic Acid Production by the Marine Alga *Cryptocodinium cohnii*. Doctoral Thesis, Delft University, Delft University Press, The Netherlands.

De Vriese, S.R., Christophe, A.B. and Maes, M. (2003). Lowered serum n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels predict the occurrence of postpartum depression: Further evidence that lowered n-PUFAs are related to major depression. *Life Sciences* 73(25)3181-3187.

DeFilippis, A.P. and Sperling, L.S. (2006). Understanding omega-3's. *Am. Heart J.* 151(3):564-570.

Dickinson, A. (2002). Benefits of Long Chain Omega-3 Fatty Acids (EPA, DHA): Help Protect Against Heart Disease.

http://www.crnusa.org/benpdfs/CRN010benefits_omega3.pdf (consultado em 22 de Outubro de 2009).

D'Souza, F.M.L., Lecossois, D., Heasman, M.P., Diemar, J.A., Jackson, C.J. and Pendrey, R.C. (2000). Evaluation of centrifuged microalgae concentrates as diets for *Panaeus monodon Fabricius* larvae. *Aquacult. Res.* 31(8-9):661-670.

Din, J. N., Newby, D.E., Flapan, A.D. (2004). Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *Br. Med. J.* 328:30-35.

Dueppen, D.G, Zeller, S.G., Diltz, S.I. and Driver, R.H. (2003). Extraction and Winterization of Lipids from Oilseed and Microbial Sources. WO 03/049832 A1.

Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M. and Garland, C.D. (1993). Changes in lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *J. Appl. Phycol.* 5:71-83.

Duttaroy, A.K. (2009). Transport of fatty acids across the human placenta: a review. *Prog. Lipid. Res.* 48:52-61.

Elibol, M. (2001). Improvement of antibiotic production by increased oxygen solubility through the addition of perfluorodecalin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76: 418-422.

Fam, S.S., Murphey, L.J., Terry, E.S., Zacket, W.E., Chen, Y., Gao, L., Pandalai, S., Milne, G.L., Roberts, L.J., Porter, N.A., Montine, T.J. and Marrow, J.D. (2002). Formation of Highly Reactive A-ring and J-ring Isoprostane-like Compounds (A4/J4-neuroprostanes) *in Vivo* from Docosahexaenoic Acid. *J. Biol. Chem.* 277(39):36076-36084.

Fan, K.W., Chen, F. Jones, E.B.G. and Vrijmoed, L.L.P. (2001). Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27:199-202.

Fan, K.W., Chen, F., Jones, E.B.G. and Vrijmoed, L.L.P. (2000). Utilization of food processing waste by Thraustochytrids in: *Aquatic Mycology across the Millennium* (eds K.D. Hyde, W.H. Ho and S.B. Pointing), *Fungal Diversity* 5:185-194.

Fan, K.W., Jiang, Y., Faan, Y.W. and Chen, F. (2007). Lipid Characterization of Mangrove Thraustochytrid – *Schizochytrium mangrovei*. *J. Agric. Food Chem.* 55:2906-2910.

Faria, M.G. and Batista, I. (2007). Actividade antioxidante de hidrolisados proteicos de bacalhau, salmão e solha. *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digital*, nº 36, pp.2-42.

Farrel, D.J. (1998). Enrichment of hen eggs with n-3 long-chain fatty acids and evaluation of enriched eggs in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:538-544.

Fensome, R. A., MacRae and Williams, G.L. Dinoflagellate Evolution and Diversity Through Time. <http://www.mar.dfo-mpo.gc.ca/science/review/e/pdf/dinoflagellate.pdf> (consultado em 2 Agosto 2009).

Ferdinandusse, S., Denis, S., Mooijer, P.A.W., Zhang, Z., Reddy, J.K., Spector, A.A. and Wanders, R.J.A. (2001). Identification of the peroxisomal β -oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* 42:1987-1995.

Fidler, N., Koletzko, B. and Sauerwald T.U. (1999). Single cell oils production and application. *Zb. Biotehnike fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, 74:37-45.

Flogia, T.A. and Sonnet, P.E. (1995). Fatty Acid Selectivity of Lipases: γ -Linolenic Acid from Borage Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72(4):417-420.

Fodor, E. Jones, R.H., Buda, C., Kitajka, K., Dey, I., and Farkas, T. (1995). Molecular Architecture and Biophysical Properties of Phospholipids During Thermal Adaptation in Fish: An Experimental and Model Study. *Lipids* 30 (12):1119-1126.

Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 497-509.

Fonseca, M. M. (2007). Estequiometria e cinética dos Processos Microbianos in: *Reactores Biológicos Fundamentos e Aplicações*, Lidel edições técnicas lda, Lisboa, Portugal, pp.3-26.

Food and Drug Administration (2001). Agency Response Letter. Grass Notice No. GRN 000080, U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services.

Food and Drug Administration (2004). Agency Response Letter. Grass Notice No. GRN 000137, U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services.

Food and Drug Administration (2005). Agency Response Letter. Grass Notice No. GRN 000160, CFSAN/Office of Food Additive Safety.

Food Standards Australia New Zealand (2004). Draft Assessment Report, Application A522, DHA-rich micro-algal oil from *Ulkenia* sp. as novel food. http://www.foodstandards.gov.au/srfiles/A522_Ulkenia_DAR_Final.pdf (consultado em 26 Outubro 2009).

Food Standards Australia New Zealand (2005). DHA-rich micro-algal oil from *Ulkenia* sp. as novel food, Final assessment report, Application A522, pp.1-108.

Franklin, S.T., Martin K.R., Baer, R.J., Schingoethe, D.J. and Hippen, A.R. (1999). Dietary Marine Algae (*Schizochytrium* sp.) Increases Concentrations of Conjugated Linoleic, Docosahexaenoic and Transvaccenic Acids in Milk of Dairy Cows. *J. Nutr.* 129:2048-2052.

Freitas, L., Bueno, T., Pérez, V.H., Santos, J.C. and de Castro, H.F. (2006). Produção de ácidos graxos poliinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo. Parte 1: Aspectos nutracêuticos e características da tecnologia actual de hidrólise. *Ciência e Cultura – Revista Científica Multidisciplinar da Fundação Educacional de Barretos* 1(1):43-49.

Fujita, T. and Makuta, M. (1983). Method of purifying eicosapentaenoic acid and its esters. U.S. Patent 4, 377,526.

Funk, C.D. (2001). Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* 294(30):1871-1875.

Galaction, A.-I., Cascaval, D., Oniscu, C. and Turnea, M. (2004). Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors. 1. Simulated fermentation broths. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 26:231-238.

Galaction, A.-I., Cascaval, D., Turnea, M. and Folescu E. (2005). Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using Oxygen-vectors 2. *Propionibacterium shermanii* broths. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27:263-271.

Gómez-Meza, N., Noriega-Rodríguez, J.A., Medina-Juárez, L.A., Ortega-García, J., Monroy-Rivera, J., Toro-Vázquez, F.J., García, H.S. and Angulo-Guerrero, O. (2003). Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. *Food Res. Int.* 36:721-727.

Ganga, A., Nieto, S., Sanhuez, J., Romo, C., Speisky, H. and Valenzuela, A. (1998). Concentration and Stabilization of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids from sardine Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(6):733-736.

Ganuza, E. and Izquierdo, M.S. (2007). Lipid accumulation in *Schizochytrium* G13/2S produced in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:985-990.

Ganuza, E., Anderson, A.J. and Ratledge, C. (2008). High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system. *Biotechnol. Lett.* 30:1559-1564.

García Camacho, F., Molina Grima, E., Martínez Sancho, M. and Sánchez Villasclaras, S. (1990). Determinación de ácidos grasos en microalgas marinas. Comparación de diversos métodos de extracción de la fracción lipídica. *Grasas Aceites* 41(1):13-18.

García, H.S., Kim, I.-H., López-Hernández, A. and Hill, C.G. (2008). Enrichment of lecithin with n-3 fatty acids by acidolysis using immobilized phospholipase A1. *Grasas Aceites* 59(4):368-374.

Garcia, M.C.C., Sevilla, J.M.F., Fernández, F.G.A., Grima, E.M. and Camacho, F.G. (2000). Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornerutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *J. Appl. Phycol.* 12:239-248.

Garcia-Ochoa, F. and Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol. Adv.* 27(2):153-176.

Gebauer, S.K., Psota, T.L., Harris, W.S. and Kris-Etherton, M. (2006). n-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am. J. Nutr.* 83(suppl):1526S-1535S.

Gerster, H. (1998). Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 68(3):159-73.

Gibon, V. (2005). Crystallization: practices and Future developments. "Fractionation-Current Status and Future Prospects in Low-Trans World", SCI Oils and Fats Group, 22-23 November, Ghent, Belgium.

Gil, A. Ramirez, M. and Gil, M. (2003). Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57(1):S31-S34.

Gill, I. and Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *TIBTECH* 15:401:409.

Giménez Giménez, A., Ibáñez González, M.J., Robles Medina, A., Molina Grima, E. García Salas, S. and Esteban Cerdán, L. (1998). Downstream processing and purification of eicosapentaenoic (20:5n-3) and arachidonic acids (20:4n-6) from microalga *Porphyridium cruentum*. *Bioseparation* 7:89-99.

Giridhar, R. and Srivastava, A.K. (2000). Productivity enhancement in L-sorbose fermentation using oxygen vector. *Enzyme Microb. Technol.* 27:537-541.

GISSI-Prevenzione Investigators (1999). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISS-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 354(9177):447-455.

Gogos, C.A., Ginopoulos, P., Apostolidou, E., Zoumbus, N.C. and Kalfarentzos, F. (1998). Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy: a randomized control trial. *Cancer* 82(2):395-402.

Gold, K. and Baren, C.F. (1966). Growth requirements of *Gyrodinium cohnii*. *J. Protozool.* 13(2):255-257.

Goldberg, E.M. and Zidovetzki, R. (1997). Effects of Dipalmitoylglycerol and Fatty Acids on Membrane Structure and Protein Kinase C Activity. *Biophys. J.* 73:2603-2614.

Gomes, N., Aguedo, M., Teixeira, J. and Belo, I. (2007). Oxygen mass transfer in a biphasic medium: Influence on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem. Eng. J.* 35:380-386.

Green A. (2004). "From alpha to omega-producing essential fatty acids in plants". *Nat. Biotechnol.* 22(6):680-682.

Guil-Guerrero J.L., and Belarbi, E.-H. (2001). Purification Process for Cod Liver Oil Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78(5):477-484.

Guil-Guerrero J.L., Campra-Madrid, P. and Navarro-Juárez, R. (2003). Isolation of some PUFA from edible oils by argentated silica gel chromatography, *Grasas Aceites* 54(2):116-121.

Guil-Guerrero, J.L., López-Martínez, J.C., Rincón-Cervera, M.A. and Campra-Madrid, P. (2007). One-Step Extration and Concentration of Polyunsaturated Fatty Acids from Fish Liver. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84:357-361.

- Gurr, M. (1998). What is “essential” in regard to lipids? *Lipid Technol.* 10:84-85.
- Haag, M. (2003). Essential Fatty Acids and the Brain. *Can. J. Psychiatry* 48(3):195-203.
- Haagsma, N., van Gent, C.M., Luten, J.B., de Jong, R.W. and van Doorn, E. (1982). Preparation of an ω 3 Fatty Acid Concentrate from Cod Liver Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59(3):117-118.
- Hackett, J.D., Anderson, D.A., Erdner, D.L. and Bhattacharya, D. (2004). Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *Am. J. Bot.* 91(10):1523-1534.
- Hadley, K.B., Ryan, A.S., Nelson, E.B. and Salem, N. (2009). An Assessment of Dietary Docosahexaenoic Acid Requirements for Brain Accretion and Turnover during Early Childhood in: *Omega-3 Fatty Acids, the Brain and Retina*, World Rev. Nutr. Diet., Basel, Karger, 99:97-104.
- Halldorsson, A., Kristinsson, B., Glynn, C. and Haraldsson, G.G. (2003). Separation of EPA and DHA in Fish Oil by Lipase-Catalyzed Esterification with Glycerol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80(9):915-921.
- Halpern, M.J. (1997). Síntese de Ácidos Gordos in: *Bioquímica*, Lidel Edições Técnicas Lda., Lisboa, pp.445-453.
- Hamazaki, T. and Okuyama, H. (2003). The Japan Society for Lipid Nutrition recommends to reduce the intake of linoleic. A review and critique of the scientific evidence. *World Rev. Nutr. Diet.* 92:109-132.
- Haraldsson, G. (1984). Separation of Saturated/Unsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61(2):219-222.
- Haraldsson, G.G. and Thorarensen, A. (1999). Preparation of Phospholipids Highly Enriched with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids by Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76(10):1143-1149.

Haraldsson, G.G. (2001). Production of Novel Fats and Oils Comprising Omega-3 Fatty Acids by Lipase. <http://www.lipidforum.org/newsonline/nr62oct2001/shortreview.htm> (consultado em 15 Novembro 2009).

Haraldsson, G.G. and Kristinsson, B. (1998). Separation of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid in Fish Oil by Kinetic Resolution Using Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(11):1551-1556.

Haraldsson, G.G., Höskuldsson, P.A., Sigurdsson, S.T., Thorsteinsson, F. and Gudbjarnason, S. (1989). The preparation of triglycerides highly enriched with ω -3 polyunsaturated fatty acids *via* lipase catalyzed interesterification. *Tetrahedron Lett.* 30:1671-1674.

Haraldsson, G.G., Kristinsson, B., Sigurdardottir, R., Gudmundsson, G.G. and Breivik, H. (1997). The Preparation of Concentrates of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase-Catalyzed Transesterification of Fish Oil with Ethanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74(11):1419-1424.

Harrington, G.W. and Holz, G.G. (1968). The monoenoic and docosahexaenoic fatty acids of a heterotrophic dinoflagellate. *Biochim. Biophys. Acta* 164:137-139.

Harris, W.S. (2003). n-3 Long-chain polyunsaturated fatty acids reduce risk of coronary heart disease death: extending the evidence to the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:279-280.

Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D.R., Leaver, M.J., Dick, J.R., Sargent, J.R and Teale, A.J. (2001). A vertebrate fatty acid desaturase with Δ 5 and Δ 6 activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(25):14304-14309.

Hayashi, K. and Kishimura, H. (1993). Separation of Eicosapentaenoic Acid-Enriched Triglycerides by Column Chromatography on Silicic Acid. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 44(1):24-31.

Hayashi, M. Yukino, T., Watanabe, F., Miyamoto, E. and Nakano, Y. (2007). Effect of Vitamin B-12 Enriched Thraustochytrids on the Population Growth of Rotifers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(1):222-225.

Hayes, D.G. (2006). Effect of temperature programming on the performance of urea inclusion compound-based free fatty acid fractionation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83(3):253-259.

Hayes, D.G., Bengtsson, Y.C., Van Alstine, J.M. and Setterwall, F. (1998). Urea Complexation for the Rapid, Ecologically Responsible Fractionation of Fatty Acids from Seed Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(10):1403-1409.

Hayes, D.G., Van Alstine, J.M. and Setterwall, F. (2000). Urea-Based Fractionation of Seed Oil Samples Containing Fatty Acids and Acylglycerols of Polyunsaturated and Hydroxy Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77(2):207-213.

Hazel, J.R. (1995). Thermal Adaptation in Biological Membranes: is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Ann. Rev. Physiol.* 57:19-42.

Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T. and Foulkes, L. (2000). Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. *Aquacult. Res.* 31(8-9):637-659.

Heipieper, H.J., Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H. and de Bont, J.A.M. (1994). Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotech.* 12:409-415.

Hejazi, M. (2003). Milking of Microalgae: Production and selective extraction of β -carotene in two-phase bioreactors. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.

Hejazi, M.A. and Wijffels, R.H. (2004). Milking of microalgae. *Trends Biotechnol.* 22(4):189-194.

Hejazi, M.A., de Lamarliere, C., Rocha, J.M.S., Vermuë, M., Tramper, J. and Wijffels, R.H. (2002). Selective extraction of carotenoid from the alga *Dunaliella salina* with retention of the viability. *Biotechnol. Bioeng.* 79(1):29-36.

Helland, I.B., Smith, S., Saarem, K., Saugstad, O.D. and Drevon, C.A. (2003). Maternal Supplementation With Very-Long-Chain n-3 Fatty Acids During Pregnancy and Lactation Augments Children's IQ at 4 Years of Age. *Pediatrics* 111:e39-e44.

Henderson R.J. (1996). Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Arch. Tierernah.* 49(1):5-22.

Henderson, R.J. and Mackinlay, E.E. (1991). Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in the Marine Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phytochemistry* 30(6):1781-1787.

Henderson, R.J. (1999). The production of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. *Lipid Technol.* 11(1):5-10.

Henderson, R.J., Leftley, J.W. and Sargent, J.R. (1988). Lipid Composition and Biosynthesis in the Marine Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phytochemistry* 27(6):1679-1683.

Heron, M. (2007). Deaths: Leading Causes for 2004. *Natl. Vital Stat. Rep.* 56(5):1-96.

Heude, B., Ducimetière, P. and Berr, C. (2003). Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes – The EVA Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:803-808.

Hibbeln, J.R. and Salem, N. (1995). Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:1-9.

Himes, M. and Beam C.A. (1975). Genetic analysis in dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*: evidence for unusual meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:4546-4549.

Himes, M. and Beam C. A. (1978). Further Studies of Breeding Restrictions among *Cryptothecodinium cohnii*-like Dinoflagellates. Evidence of a New Interbreeding Group. *J. Protozool.* 25(3):378-380.

Hinzpeter, I., Shene, C. and Masson, L. (2006). Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *Grasas Aceites* 57(3):336-342.

Hirafuji, M., Machida, T., Hamaue, N., and Minami, M. (2003). Cardiovascular Protective Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids With Special Emphasis on Docosahexaenoic Acid. *J. Pharmacol. Sci.* 92:308-316.

Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A. and Schwager, S.J. (2004). Global Assessment of Organic Contaminants in Farmed Salmon. *Science* 303(5665):226-229.

Ho, C.S., Ju, L.-K. and Baddour, R.F. (1990). Enhancing Penicillin Fermentations by Increased Oxygen Solubility Through the Addition of *n*-Hexadecane. *Biotechnol. Bioeng.* 36:1110-1118.

Hoffman, D.R., Wheaton, K.H., James, K.J., Tuazon, M., Diersen-Schade, D.A., Harris, C.L., Stolz, S. and Berseth, C.L. (2006). Docosahexaenoic Acid in Red Cells of Term Infants Receiving Two Levels of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 42:287-292.

Hoffman, E.K. and Dunham, P.B. (1995). Membrane Mechanisms and Intracellular Signalling in Cell Volume Regulation in: *International Review of Cytology*, Academic Press, Inc., San Diego, California, USA, pp.173-262.

Holman, R.T. and Ener, S. (1954). Use of urea-inclusion compound containing essential fatty acid in an experimental diet. *J. Nutr.* 461-467.

Holman, R.T. (1998). The Slow Discovery of the Importance of ω -3 Essential Fatty Acids in Human Health. *J. Nutr.* 128:427S-433S.

Holub, B. (2006). DHA/EPA and the Omega-3 Nutrition Gap. DHA/EPA Omega-3 Institute. www.dhaomega3.org (consultado em 1 Novembro 2009).

Holub, B.J. (2002). Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Can. Med. Assoc. J.* 166(5):608-615.

Holub, D.J. and Holub B.J. (2004). Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Mol. Cell Biochem.* 263(1-2):217-225.

Holz, G.G. and Beach, D.H. (1980). Lipids of *Cryptocodinium cohnii*. *J. Protozool.* 27:A37-A37.

Horrocks, L.A. and Yeo, Y.K. (1999). Docosahexaenoic Acid-Enriched Foods: Production and Effects of Blood Lipids. *Lipids* 34(supplement):S313.

Horrocks, L.A. and Yeo, Y.K. (1999). Health benefits of Docosahexaenoic Acid (DHA). *Pharmacol. Res.* 40(3):211-225.

Hoshino, T., Yamane, T. and Shimizu, S. (1990). Selective Hydrolysis of Fish Oil by Lipase to Concentrate n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Agric. Biol. Chem.* 54(6):1459-1467.

Hu, F.B., Manson, J.E. and Willett, W.C. (2001). Types of Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review. *J. Am. Coll. Nutr.* 20(1):5-19.

Huang, J., Aki, T., Hachida, K., Yokochi, T., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. and Suzuki, O. (2001). Profile of Polyunsaturated Fatty Acids Produced by *Thraustochytrium* sp. KK17-3. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78(6):605-610.

Huang, J., Aki, T., Kawamoto, S. Shigeta, S. Ono, K. and Suzuki, O. (2002). Enzymatic Preparation of Glycerides Rich in Docosahexaenoic Acid from Thraustochytrid Single Cell oils by *Candida rugosa* Lipase. *J. Oleo Sci.* 51(7):447-455.

Huang, K.-H. and Akoh, C.C. (1994). Lipase-Catalyzed Incorporation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids into Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71(11):1277-1280.

Huang, Y.-S., Pereira, S.L. and Leonard, A.E. (2004). Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochemie* 86:793-798.

Huisman M., van Beusekom C.M., Lanting, C.I., Nijeboer H.J. Muskiet, F.A. and Boersma E.R. (1996). Triglycerides, fatty acids, sterols, mono- and disaccharides and sugar alcohols in human milk and current types of infant formula milk. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50(4):255-260.

Hur, B.-K., Cho, D.-W., Kim, H.-J., Park, C.-I. and Suh, H.-J. (2002). Effect of Culture Conditions on Growth and Production of Docosahexaenoic Acid (DHA) using *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7:10-15.

Hwang, L.S. and Liang, J.-H. (2001). Fractionation of Urea-Pretreated Squid Visceral Oil Ethyl Esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78(5):473-476.

Ibañez González, M.J., Robles Medina, A., Molina Grima, E., Giménez Giménez, Cartens, M. and Esteban Cerdán, L. (1998). Optimization of Fatty Acid Extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 Biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(12):1735-1740.

Iida, I., Nakahara, T., Yokochi, T., Kamisaka, Y., Yagi, H., Yamaoka, M. and Suzuki, O. (1996). Improvement of Docosahexaenoic Acid Production in a Culture of *Thraustochytrium aureum* by Medium Optimization. *J. Ferment. Bioeng.* 81(1):76-78.

Infante, J.P. and Huszagh, V.A. (1998). Analysis of putative role of 24-carbon polyunsaturated fatty acids in the biosynthesis of docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *FEBS Lett.* 431:1-6.

Innis, S.M. (1991). Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* 30(1):39-103.

Innis, S.M. (2003). Perinatal biochemistry and Physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Pediatr.* 143:S1-S8.

Innis, S.M. (2004). Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 554:27-43.

Innis, S.M. (2007). Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development. *J. Nutr.* 137(55-859).

Innis, S.M., Gilley, J. and Werker, J. (2001). Are human milk long-chain polyunsaturated fatty acids related to visual and neural development in breast-fed term infants? *J. Pediatr.* 139(4):532-538.

International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (2004). Report on dietary Intake of Polyunsaturated Fatty Acids in Health Adults. <http://issfal.org.uk> (consultado em 12 Novembro 2009).

Ishida, Y. and Kadota, H. (1965). Metabolism of acetate in *Gyrodinium cohnii*. *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* 26:10-17.

IUPAC (1971). Nomenclature of Organic Chemistry, Definitive Rules for Sections A, B, C, D, E, F, and H, 2nd edit., Butterworths, London.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1978). The Nomenclature of Lipids (Recommendations 1976). *J. Lipid Res.* 19:114-128.

Jakobsen, A.N., Aasen, I.M., Josefen, K.D. and Strøm, A.R. (2008). Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain T66: effects of N and P starvation and O₂ limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:297-306.

Jakobsson, A., Westerberg, R. and Jacobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 45(3):237-249.

James, M.J., Gibson, R.A. and Cleland, L.G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(suppl): 343S-348S.

Jatoi A. (2005). Ω -3 Fatty Acid Supplements for Cancer-Associated Weight Loss. *Nutr. Clin. Pract.* 20(4):394-399.

Jensen, C.L. (2006). Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 83(suppl):1452S-1457S.

Jho, D.H., Cole, S.M., Lee, E.M. and Espat, N.J. (2004). Role of Omega -3 Fatty Acid Supplementation in Inflammation and Malignancy. *Integr. Cancer Ther.* 3(2):98-111.

Jia, S., Wang, M., Kahar, P., Park, Y. and Okabe, M. (1997). Enhancement of yeast fermentation by addition of oxygen vectors in air-lift bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* 84(2):176-178.

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

Jiang, Y. and Chen, F. (1999). Effects of salinity on cell growth and docosahexaenoic acid content in the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:508-513.

Jiang, Y. and Chen, F. (2000a). Effects of medium glucose and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochem.* 35:1205-1209.

Jiang, Y. and Chen, F. (2000b). Effects of Temperature and Temperature Shift on Docosahexaenoic Acid Production by the Marine Microalga *Cryptocodinium cohnii*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77(6):613-617.

Jiang, Y., Chen, F. and Li, H.B. (2001). Effects of nitrogen source and vitamin B12 on docosahexaenoic acid production by *Cryptocodinium cohnii* in: *Algae and their Biotechnological Potential*, Kluwer Academic Publishers, pp.69-78.

Jianlong, W. (2000). Enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* using *n*-dodecane as an oxygen-vector. *Process Biochem.* 35(10):1079-1083.

Judge, M.P., Harel, O. and Lammi-Keefe, C.J. (2007b). Maternal consumption of a docosahexaenoic acid-containing functional food during pregnancy: benefit for infant performance on problem-solving but not on recognition memory tasks at age 9 mo. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(6):1571-1577.

Judge, M.P., Harel, O. and Lammi-Keefe, C.J. (2007a). A Docosahexaenoic Acid-Functional Food During Pregnancy Benefits Infant Visual Acuity at four but not Six Months of Age. *Lipids* 42:117-122.

Jump D.B. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 13(2):155-164.

Kalmijn, S., Launer, L.J., Ott, A., Witteman, J.C.M., Hofman, A. and Breteler, M.M.B. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam study. *Ann. Neurol.* 42(5):776-782.

Kalmijn, S., van Boxtel, M.P.J., Ocké, M., Verschuren, W.M.M., Kromhout, D. and Launer, L.J. (2004). Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* 62:275-280.

Kamlangdee, N. and Fan, K.W. (2003). Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 25(5):643-650.

Kandasamy, N., Joseph, F. and Goenka, N. (2008). The role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease, hypertriglyceridaemia and diabetes mellitus. *Br. J. Diabetes Vasc. Dis.* 8(3):121-126.

Kang, D.-H., Jeh, E.-J., Seo, J.-W., Chun, B.-H. and Hur, B.-K. (2007). Effect of salt concentration on production of polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Korean J. Chem. Eng.* 24(4):651-654.

Kang, J.X. and Leaf, A. (1996). Antiarrhythmic Effects of Polyunsaturated Fatty Acids. Recent Studies. *Circulation* 94:1774-1780.

Kang, J.X. and Leaf, A. (2000). Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(1):202-207.

Kang, J.X. and Weylandt, K.H. (2008). Modulation os Inflammatory Cytokines by Omega-3 Fatty Acids in: *Lipids in Health and Disease, Subcell Biochem.* 49:133-143.

Kendrick, A. and Ratledge, C. (1992). Lipids of Selected Molds Grown for Production of n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Lipids* 27(1):15-20.

Kennedy, M. and Krouse, D. (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:456-475.

Kim, H.O., Lim, J.M., Joo, J.H., Kim, S.W., Hwang, H.J., Choi, J.W. and Yun, J.W. (2005). Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and expolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresour. Technol.* 96:1175-1182.

King, M.W. (2009). Metabolism of the Eicosanoids.

<http://themedicalbiochemistrypage.org/lipid-synthesis.html> (consultado em 12 Novembro 2009).

Kiy, T., Rüsing, M. and Fabritius, D. (2005). Production of Docosaehaenoic Acid by the Marine Microalga, *Ulkenia* sp., in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp.99-106.

Kofoid, C.A., Swenzy, O. (1921). The Free living unamored Dinoflagellata. Mem University, Calif 5:1-562.

Koletzko, B. and Braun, M. (1991). Arachidonic acid and early human growth: is there a relation? *Ann. Nutr. Metab.* 35(3):128-131.

Koletzko, B., Agostoni, C., Carlson, S.E., Clandinin, T., Hornstra, G., Neuringer, M., Uauy, R., Yamashiro, Y. and Willatts, P. (2001a). Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and perinatal development. *Acta Paediatr.* 90:460-464.

Koletzko, B., Lien, E., Agostoni, C., Böhles, H., Campoy, C., Centi, I., Decsi, T., Dudenhausen, J.W., Dupont, C., Forsyth, S., Hoesli, I., Holzgreve, W., Lapillone, A., Putet, G., Secher, N.J., Symonds, M., Szajewska, H., Willatts, P. and Uauy R. (2008). The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J. Perinat. Med.* 36:5-14.

Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R. and Sauerwald, T. (2001b). Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human. Dev.* 65(Suppl.):S3-S18.

Komazwaa, H., Kojima, M., Aki, T., Ono, K. and Kawakami, M. (2008). Microorganism Having an Ability of Producing Docosahexaenoic Acid and Use Thereof. US Patent 2008/0009045 A1.

Krauss, R.M., Eckel, R.H., Howard, B., Appel, L.J., Daniels, S.R., Deckelbaum, R.J., Erdman, J.W., Kris-Etherton, P., Golberg, I.J., Kotchen, T.A., Lichtenstein, A.H., Mitch, W.E., Mullis, R., Robinson, K., Wylie-Rosett, J., St. Jeor, S., Suttie, J., Tribble, D.L. and Bazzarre, T.L. (2000). Revision 2000: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee of the American Heart Association. *J. Nutr.* 131:132-146.

Kremer, J.M. (2000). n-3 Fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(suppl):349S-351S.

Kreulen, H.P. (1976). Fractionation and Winterization of Edible Fats and Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53:393-396.

Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. and Appel, L.J. (2002). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation* 106:2747-2757.

Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. and Appel, L.J. (2003). Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:151-152.

Kris-Etherton, P.M., Taylor, D.S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R.L., Zhao, G. and Etherton, T.D. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(1):179-188.

Kroes, R., Schaefer, E.J., Squire, R.A and Williams, G.M. (2003). A review of the safety of DHA 45-oil. *Food Chem. Toxicol.* 41(11):1433-1446.

Kromhout, D. (1993). Epidemiological aspects of fish in the diet. *Proc. Nutr. Soc.* 52:437-439.

Kromhout, D., Bosschieter, E.B. and Coulander, L. (1985). The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *New Engl. J. Med.* 312:1205-1209.

Kromhout, D., Feskens, E.J.M. and Bowles, C.H. (1995). The Protective Effect of a Small Amount of Fish on Coronary Heart Disease Mortality in the Elderly Population. *Int. J. Epidemiol.* 24(2):340-345.

Kubai, D.F. and Ris H. (1969). Division in the Dinoflagellate *Gyrodinium cohnii* (Schiller). A New Type of Nuclear Reproduction. *J. Cell Biol.* 40:508-528.

Kumar, S.R., Chandramohan, D.R. and Desa, E. (2002). Method for Enhancing levels of Polyunsaturated Fatty Acids in Thraustochytrid Fungi. US Patent 6,410,282 B1.

Kumar, S.R., Jain, R., Kamath, J., Prabhu, S. and Suryanarayan, S. (2004). A Method for Enhancing Levels of Polyunsaturated Fatty Acids in Thraustochytrid Protists. WO 2004/083442 A2.

Kumon, Y., Yokochi, T. and Nakahara, T. (2005). High yield of long-chain polyunsaturated fatty acids by labyrinthulids on soybean lecithin-dispersed agar medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:253-258.

Kumon, Y., Yokoyama, R., Haque, Z., Yokochi, T., Honda, D. and Nakahara, T. (2006). A new Labyrinthulid Isolate That Produces Only Docosahexaenoic Acid. *Mar. Biotechnol.* 8:170-177.

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

Kung, H.C., Hoyert, D.L., Xu, J.Q. and Murphy, S.L. (2008). Deaths: Final data for 2005. National vital statistics reports, vol 56, no 10, Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics, pp.1-124.

Kurlandsky, L.E., Bennink, M.R., Webb, P.M., Ulrich, P.J. and Baer, L.J. (1994). The absorption and effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on serum leukotriene B4 in patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 18(4):211-217.

Kwok, A.C.M. and Wong J.T.Y. (2003). Cellulose Synthesis Is Coupled to Cell Cycle Progression at G1 in the Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Plant Physiol.* 131:1681-1691.

Kwok, A.C.M. and Wong J.T.Y. (2005). Lipid buisynthesis and its coordination with cell cycle progression. *Plant Cell Physiol.* 46(12):1973-1986.

Kyle, D. (1989). Market applications for microalgae. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66(5):648-653.

Kyle, D.J., Reeb, S.E. and Sicotte, V.J. (1991). Docosahexaenoic acid, methods for its production and compounds containing the same. Martek Corporation, WO 91/11918.

Kyle, D. (2005). The Future Development of Single Cell Oils, in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp. 239-248.

Kyle, D.J. (1996). Production and use of a single cell oil which is highly enriched in docosahexaenoic acid. *Lipid Technol.* 8:107-110.

Kyle, D.J. (2004). Use of docosahexaenoic acid for the manufacture of a medicament for the treatment of senile dementia and Alzheimer's disease. Martek Biosciences Corporation. E Patent 1419780 A1.

Kyle, D.J., Reeb, S.E. and Sicotte, V.J. (1995). Production of docosahexaenoic acid by dinoflagellates, Martek Corporation. US Patent 5,407,957.

Kyle, D.J., Reeb, S.E. and Sicotte, V.J. (1998). Dinoflagellate biomass, methods for its production, and compositions containing the same. Martek Biosciences Corporation. US Patent 5,711,983.

Kyle, D.J., Sicotte, V.J., Singer, J. and Reeb, S.E. (1992). Bioproduction of docosahexaenoic acid (DHA) by microalgae, in: *Industrial applications of single cell oils*, Kyle, D.J., Ratledge C. (eds), American Oil Chemists' Society, Champaign, pp.287-300.

Lai, L.-S., Tsai, T.-H. and Wang, T.C. (2002). Application of Oxygen Vectors to *Aspergillus terreus* Cultivation. *J. Biosci. Bioeng.* 94(5):453-459.

Lall, S.P. (2000). *Nutrition and health of fish*, in: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M. A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds): *Avances en Nutrición Acuícola BV. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 12-22, Mérida, Yucatán, México.

Langholz, P. Andersen, P., Forskov, T. and Schmidtsdorff, W. (1989). Application of a Specificity of *Mucor miehei* Lipase to Concentrate Docosahexaenoic Acid (DHA): *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66(8):1120- 1123.

Larson, S.C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M. and Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:935-945.

Leaf, A. and Weber, C. (1987). A new era for science and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 45:1048-1053.

Leaf, A., Albert, C.M., Josephson, M., Steinhaus, D., Kluger, J., Kang, J.X., Cox, B., Zhang, H. and Schoenfeld, D. (2005). Prevention of Fatal Arrhythmias in High-Risk Subjects by Fish Oil n-3 Fatty Acid Intake. *Circulation* 112:2762-2768.

Leaf, A., Kang, J.X., Xiao, Y.-F., Billman, G.E. and Voskuyl, R.A. (1999). The Antiarrhythmic and Anticonvulsant Effects of Dietary N-3 Fatty Acids. *J. Membrane Biol.* 172:1-11.

Leaño, E.M., Gapasin, R.S.J., Polohan, B. and Vrijmoed, L.L.P. (2003). Growth and fatty acid production of thraustochytrids from Panay mangroves, Philippines. *Fungal Diversity* 12:111-122.

Lee, T.-K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.* 13:307-315.

Lemaitre, R.N., King, I.B., Mozaffarian, D., Kuller, L.H., Tracy, R.P. and Siscovick, D.S. (2003). n-3 Polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: cardiovascular Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:319-25.

Leman, J. (1997). Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential. *Adv. Appl. Microbiol.* 43:195-243.

Leonard, A.E., Pereira, S.L., Sprecher, H. and Huang, Y.-S. (2004). Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 43:36-54.

Lepage, G. and Roy, C.C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* 27:114.

Lewis, T.E., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A. (1999). The Biotechnological Potential of Thraustochytrids. *Mar. Biotechnol.* 1:580-587.

Li, Z.-Y. and Ward, O.P. (1993a). Enzyme catalysed production of vegetable oils containing omega-3 polyunsaturated fatty acid. *Biotechnol. Lett.* 15:185-188.

- Li, Z.-Y. and Ward, O.P. (1993b). Lipase-Catalyzed Esterification of Glycerol and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Concentrate in Organic Solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70(8):745-748.
- Li, Z.-Y. and Ward, O.P. (1994). Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 13(4):238-241.
- Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M. (2004). Extraction, fractionnement et concentration des huiles marines. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 11(2):123-130.
- Linko, Y.-Y. and Hayakawa, K. (1996). Docosahexaenoic acid: A valuable nutraceutical? *Trends Food Sci. Tech.* 7:59-63.
- Liu, C.-P. and Lin, L.-P. (2001). Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP 1324. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42:207-214.
- Loeblich, A.R. (1976). Dinoflagellate Evolution: Speculation and Evidence. *J. Protozool.* 23(1):13-28.
- López Alonso, D. and García Maroto, F. (2000). Plants as “chemical factories” for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.* 18:481-497.
- López Alonso, D., García-Maroto, F., Rodríguez-Ruiz, J., Garrido, J.A., and Vilches, M.A. (2003). Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. *Biochem. Sys. Ecol.* 31:1111-1124.
- López-Martínez, J.C., Campra-Madrid, P. and Guil-Guerrero, J.L. (2004). γ -Linolenic Acid Enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* Seed Oils and Fatty Acids by low Temperature Crystallization. *J. Biosci. Bioeng.* 97(5):294-298.
- Los, D.A. and Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. *BBA-Lipid Lipid Met.* 1394(1):3-15.

Lowe, K.C., Davey, M.R. and Power, J.B. (1998). Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. *Trends Biotechnol.* 16(6):272-277.

Luthria, D.L., Mohammed, B.S. and Sprecher, H. (1996). Regulation of the Biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid. *J. Biol. Chem.* 27(5):16020-16025.

Lynch, K. (2007). Fatty acids and the enigma of omega 3. *The Biomedical Scientist* 51(1): 34-36.

MacDonald, A.M.S. (2006). Omega-3 Fatty Acids as Adjunctive Therapy in Crohns Disease. *Gastroenterol. Nurs.* 29(4):295-301.

MacLean G.T. (1977). Oxygen diffusion rates in organic fermentations broths. *Process Biochem.* 12:22-28.

MacLean, C.H., Newberry, S.J., Mojica, W.A., Khanna, P., Issa, A.M., Suttorp, M.J., Lim, Y.W., Traina, S.B., Hilton, L., Garland, R. and Morton, S.C. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA* 295(4):403-415.

Maehr, H., Zenchoff, G. and Coffen, D.L. (1994). Enzymic Enhancement of n-3 Fatty Acid Content in Fish Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71(5):463-467.

Marchioli, R. on behalf of the GISSI-Prevenzione Investigators (2001). Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: results of GISSI-Prevenzione Trial. *Eur. Heart J. Suppl.* 3(Supplement D):D85-D97.

Marchioli, R., Barzi, F., Bomba, E., Chieffo, C., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., Franzosi, M.G., Geraci, E., Levantesi, G., Maggioni, A.P., Mantinni, L., Marfisi, R.M., Mastrogiuseppe, G., Minimi, N., Nicolosi, G.L., Santini, M., Schweiger, C., Tavazzi, L., Tognoni, G., Tucci, C. and Valagussa, F. on behalf of the GISSI-Prevenzione Investigators (2002). Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo

Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105(16):1897-1903.

Marchioli, R., Schweiger, C., Tavazzi, L. and Valagussa, F. (2001). Efficacy of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids after Myocardial Infarction: Results of GISSI-Prevenzione Trial. *Lipids* 36:S119-S126.

Martek Biosciences Corporation (2008). [http:// www.martek.com/About/History.aspx](http://www.martek.com/About/History.aspx) (consultado em 1 Novembro de 2009).

Martek Biosciences Corporation (2009). www.nasdaq.com/MorningStarProfileReports/MATK_USA.pdf (consultado em 1 Novembro de 2009).

Martin, A. (2001). The “apports nutritionnels coinseillés (ANC)” for the French population. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:119-128.

Martinez, M. (1992). Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr.* 120:S129-S138.

Maysr, P., Mrowietz, U., Arenberger, P., Bartak, P., Buchvald, J., Christophers, E., Jablonska, S., Salmhofer, W., Schill, W.B., Krämer, H.J., Schlotzer, E., Mayer, K., Seeger, W. and Grimminger, F. (1998). Omega-3 fatty acids-based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *J. Am. Acad. Dermatol.* 38(4):539-547.

McCann, J.C. and Ames, B.N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am. J. Clin. Nutr.* 82:281-295.

McGuire, S.O., Alexander, D.W. and Fritsche, K.L. (1997). Fish Oil Source Differentially Affects Rat Immune Cell α -Tocopherol Concentration. *J. Nutr.* 127:1388-1394.

McNamara, R.K. and Carlson, S.E (2006). Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75(4-5):329-349.

Mendes, R.L. (1995). Extracção supercrítica de lípidos de microalgas. Tese de Doutoramento, I.S.T., Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Mendoza, H., Cedres, C.M., de la Jara, A., Nordström, L., Freijanes, K. and Carmona, L. (2008). Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno. *Grasas Aceites* 59(1): 27-32.

Menge, M., Mukherjee, J. and Scheper, T. (2001). Application of oxygen vectors to *Claviceps purpurea* cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:411-416.

Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domerge, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V. and Browse, J. (2001). Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Polyketide Synthases in Both Prokaryotes and Eukaryotes. *Science* 293:290-293.

Meyer, A., Cirpus, P., Ott, C., Schlecker, R., Zähringer, U. and Heinz, E. (2003). Biosynthesis of Docosahexaenoic Acid in *Euglena gracilis*: Biochemical and Molecular Evidence for the Involvement of a $\Delta 4$ -Fatty Acyl Group Desaturase. *Biochemistry* 42(32):9779-9788.

Mickleborough, T.D., Lindley, M.R., Ionescu, A.A. and Fly, A.D. (2006). Protective Effect of Fish Oil Supplementation on Exercise-Induced Bronchoconstriction in Asthma. *CHEST* 129:39-49.

Miles, R.D. and Chapman, F.A. (2006). The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets. <http://edis.ifas.ufl.edu/FA122> (consultado em 23 Outubro 2009).

Miller, C., Austin, H., Posorske, L. and Gonzalez, J. (1988). Characteristics of an Immobilized Lipase for Commercial Synthesis of Esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65(5):927-931.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3):426-428.

Miquel, M., James, D., Dooner, H. and Browse, J. (1993). *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6208-6212.

Mitchell, E.A., Aman, M.G., Turbott, S.A. and Manku, M. (1987). Clinical Characteristics and Serum Essential Fatty Acid Levels in Hyperactive Children. *Clin. Pediatr.* 26(8):406-411.

Moffat, C.F., McGill, A.S., Hardy, R. and Anderson, R.J. (1993). The Production of Fish Oils Enriched in Polyunsaturated Fatty Acid-Containing Triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70(2):133-138.

Molina Grima, E. (1996). Producción y Purificación de Ácidos Grasos Poliinsaturados a partir de Microalgas. *Lección Inaugural del Curso Académico 1996-1997*, Universidad de Almería, pp.5-28.

Molina Grima, E., Acién Fernández, F.G., García Camacho, F. and Chisti, Y. (1999a). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *J. Biotech.* 70: 231-247.

Molina Grima, E., Belarbi, E.-H., Acién Fernández, F.G., Robles Medina, A. and Yusuf Chisti (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotech. Adv.* 20:491-515.

Molina Grima, E., Acién Fernández, F.G. and Robles Medina, A. (2004). Downstream Processing of Cell-mass and Products in: *Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Publishing Ltd, pp. 215-251.

Molina Grima, E., Robles Medina, A. and Giménez Giménez, A. (1999b). Recovery of algal PUFAs in: *Chemicals from Microalgae*, Cohen Z., ed, Taylor & Francis, London, pp.108-144.

Molina Grima, E., Robles Medina, A., Giménez Giménez, A. and Ibáñez González, M.J. (1996). Gram-scale purification of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) from wet *Phaeodactylum tricorutum* UTEX 640 biomass. *J. Appl. Phycol.* 8:359-367.

Molina Grima, E., Robles Medina, A., Giménez Giménez, A., Sánchez Pérez, J.A., Garcia Camacho, F. and García Sánchez, J.L. (1994). Comparison Between Extraction of Lipids and Fatty Acids from Microalgal Biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71(9):955-959.

Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., García Sánchez, J.L. and López Alonso D. (1993). n-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:599-605.

Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., Garcia Camacho, F., Robles Medina, A., Giménez Giménez, A. and López Alonso D. (1995). The Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Microalgae: from Strain Selection to Product Purification. *Process Biochem.* 30(8):711-719.

Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Sánchez, J.L., García Camacho, F., and López Alonso D. (1992). EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity. *Process Biochem.* 27(5):299-305.

Moreau, H., Géraud, M.L., Bhaud, Y. and Soyer-Gobillard, M.O. (1998). Cloning, characterization and chromosomal localization of a repeated sequence in *Cryptocodinium cohnii*, a marine dinoflagellate. *Int. Microbiol.* 1(1):35-43.

Morgan-Kiss, R.M., Priscu, J.C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L. and Huner, N.P.A. (2006). Adaptation and Acclimation of Photosynthetic Microorganisms to Permanently Cold Environments. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 70(1): 222-252.

Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Wilson, R.S., Aggarwal, N. and Schneider, J. (2003). Consumption of Fish and n-3 Fatty Acids and Risk of Incident Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.* 60:940-946.

Mozaffarian, D. and Rimm, E.B. (2006). Fish Intake, Contaminants, and Human Health. *JAMA* 296:1885-1899.

Mozaffarian, D., Stein, P.K., Prineas, R.J. and Siscovick, D.S. (2008). Dietary Fish and ω -3 Fatty Acid Consumption and Heart Rate Variability in US Adults. *Circulation* 117:1130-1137.

Murata N. and Wada, H. (1995) Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308:1-8.

Nakahara, T., Yokochi, T., Higashihara, T., Tanaka, S., Yaguchi, T. and Honda, D. (1996). Production of Docosahexaenoic and Docosapentaenoic Acids by *Shizochytrium* sp. Isolated From Yap Islands. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(11):1421-1426.

Nakamura, M.T. and Nara, T.Y. (2004). Structure, Function and Dietary Regulation of Δ 6, Δ 5 and Δ 9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* 24:345-376.

Nakamura, T., Fukuda, M. and Tanaka, R. (1996). Estimation of polyunsaturated fatty acid content in lipids of aquatic organisms using thin-layer chromatography on a plain silica gel plate. *Lipids* 31(4):427-432.

Napier, J.A. (2002). Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms. *Trends Plant Sci.* 7(2):51-54.

Napier, J.A. (2007). Perspective Transgenic plants as a source of fish oils: health, sustainable and GM. *J. Sci. Food Agric.* 87(8):8-12.

Napier, J.A. and Sayanova, O. (2005). The production of very-long-chain PUFA biosynthesis in transgenic plants: towards a sustainable source of fish oils. *Proc. Nutr. Soc.* 64:387-393.

- Napier, J.A., Michaelson, L. V. and Sayanova, O. (2003). The role of cytochrome *b₅* fusion desaturases in synthesis of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68(2):135-143.
- Nerad, T.A. (1993). American type culture collection, catalogue of protists, 18th edn. Rockville, USA.
- Newman, W.P., Middaugh, J.P., Propst, M.T. and Rogers D.R. (1993). Atherosclerosis in Alaska Natives and non-natives. *Lancet* 341:1056-1057.
- Newton, I. (1998). Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids: The New Frontier in Nutrition. *Lipid Technol.* 10: 477-481.
- Nielsen, D.R., Daugulis, A.J. and McLellan, P.J. (2003b). A Novel Method of Simulating Oxygen mass Transfer in Two-Phase Partitioning Bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 83(6):735-742.
- Nielsen, J., Villadsen, J. and Lidén, G.K. (2003a). From Cellular Function to Industrial Products in: *Bioreaction Engineering Principles*, 2nd edition, Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, USA, pp. 9-45.
- Noaghiul, S. and Hibbeln, J.R. (2003). Cross-National Comparations of Seafood Consumption and Rates of Bipolar Disorders. *Am. J. Psychiatry* 160:2222-2227.
- Norish, A.E., Skeaff, C.M., Arribas, G.L.B., Sharpe, S. J. and Jackson, R.T. (1999). Prostate cancer risk and consumption of fish oils: a dietary biomarker-based case-control study. *Br. J.Cancer* 81:1238-1242.
- O'Keefe, S.F. (2008). Nomenclature and Classification of Lipids in: *Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 3-37.
- Ocean Nutrition Canada (2009). Food Ingredients. <http://www.onc.ca/Products/FI/MEG-3FI.php> (consultado em 20 Setembro de 2009).

Official Journal of the European Union (2003). Commission Decision of 5 June 2003 authorising the placing on the market of oil rich in DHA (docosahexaenoic acid) from the microalgae *Schizochytrium* sp. as a novel food ingredient under Regulation (EC) N°.258/97 of the European Parliament and of the Council (2003 /427/EC). OJ L144/13, 12.6.03.

Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* 20:459-466.

Oliveira, A.C.M., Stone, D.A.J., Plante, S. Smiley, S., Bechtel, P.J. and Hardy, R.W. (2006). Fish oils from Alaskan seafood processing by-products: an un-exploited sustainable resource for aquaculture feeds. *WAS Meeting Abstract, AQUA 2006*, Florence, Italy, 9-13 May.

Olsen, S.F. and Secher, N.J. (1990). A possible preventive effect of low-dose fish oil on early delivery and pre-eclampsia: indications from 50-year-old controlled trial. *Br. J. Nutr.* 64(3):599-609.

Olsen, S.F., Sørensen, J.D., Hedegaard, M., Henriksen, T.B., Hansen, H.S. and Grant A. (1992). Randomised controlled trial of effect of fish-oil supplementation on pregnancy duration. *Lancet* 339(8800):1003-1007.

OmegaTech (2001). Application for the Approval of DHA-rich Oil. Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of the 27th January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients.

<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/dhagolddossier.pdf> (consultado em 15 Novembro 2009)

Osada, K. Takahashi, K. and Hatano, M. (1990). Polyunsaturated Fatty Glyceride Syntheses by Microbial Lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67(12):921-922.

Özcimder, M. and Hammers, G. (1980). Fractionation of fish oil fatty acid methyl esters by means of argentation and reversed-phase high-performance liquid chromatography, and its utility in total fatty acid analysis. *J. Chromatogr. A* 187(2):307-317.

Parrow, M.W. (2003). Feeding, Reproduction, and Sexuality in *Pfiesteria* spp. and Cryptoperidiniopsisoid Estuarine Heterotrophic Dinoflagellates. Doctoral Thesis, North Carolina State University, Raleigh.

Parrow, M.W., Elbrächter, M., Krause, M.K., Burkholder, J.M., Deamer, N.J., Htyte, N. and Allen, E.H. (2006). The taxonomy and growth of a *Cryptocodinium* species (Dinophyceae) isolated from a brackish-water fish aquarium. *Afr. J. Mar. Sci.* 28(2):185-191.

Pereira, S.L., Huang, Y.-S., Kinney, A.J., Stecca, K.L., Packer, J.C.L. and Mukerji, P. (2004a). A novel ω 3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochem. J.* 378:665-671.

Pereira, S.L., Leonard, A.E. and Mukerji, P. (2003). Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukariotes. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 68(2):97-106.

Pereira, S.L., Leonard, A.E., Huang, Y.-S., Chuang, L-T and Mukerji, P. (2004b). Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the ω -3 fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid. *Biochem. J.* 384:357-366.

Perret, E. Alberta, M., Bordes, N. Bornens, M. Soyer-Gobillard, M.-O. (1991). Microtubular spindle and centrosome structures during the cell cycle in a dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* B – an immunocytochemical study. *Biosystems* 24:53-65.

Perret, E., Davoust, J., Albert, M., Besseau, L. and Soyer-Gobillard, M.-O. (1993). Microtubule organization during the cell cycle of the primitive eukaryote dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *J. Cell Sci.* 104:639-651.

Perretti, G., Bravi, E., Mantanari, L. and Fantozzi, P. (2003). Extraction of PUFAs rich oil from algae with supercritical carbon dioxide. *Proceeding of the 6th International symposium of supercritical fluids*. Versailles, France, 28-29 April, pp.29-34.



Perrut, M. (1988). Purification of polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) ethyl esters by preparative high performance liquid chromatography. *LC GC* 6(10):914-920.

Perry R.H., and Green, D.W. (1999). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 7th ed. McGraw-Hill, New York, pp.14.1-14.98.

Perveen, Z., Ando, H., Ueno, A., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yamada, Y., Tagaki, T., Kaneko, T., Kogame, K. and Okuyama H. (2006). Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid. *Biotechnol. Lett.* 28:197-202.

Pettinello, G., Bertucco, A., Pallado, P. and Stassi, A. (2000). Production of EPA enriched mixtures by supercritical fluid chromatography: from the laboratory scale to the pilot plant. *J. Supercrit. Fluids* 19:51-60.

Ploskón, E., Arthur, C.J., Evans, S.E., Williams, C., Crosby, J., Simpson, T.J. and Crump, M. (2008). A Mammalian Type I Fatty Acid Synthase Acyl Carrier Protein Domain Does Not Sequester Acyl Chains. *J. Biol. Chem.* 283(1):518-528.

Poisson, L. and Ergon F. (2001). Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. *J. Biotechnol.* 91(1):75-81.

Pringsheim, E.G. (1956). Micro-organisms from decaying Seaweed. *Nature* 178:480-481.

Pronova Biopharma (2009). Production facilities.

http://www.pronova.com/Home/About_us/Pronova_BioPharma_in_brief/Production_facilities/ (consultado em 15 Novembro 2009).

Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:287-293.

Pulz, O. and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:635-648.

Pyle, D. and Wen, Z. (2007). Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid from Biodiesel – Waste Glycerol by Microalgal Fermentation, 2007 ASAE Annual Meeting 077028.

Pyle, D.J. (2008). Use of Biodiesel-Derived Crude Glycerol for the Production of omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids by the Microalga *Schizochytrium limacinum*. Master Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA.

Pyle, D.J., Garcia, R.A., and Wen, Z. (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(11):3933-3939.

Qi, B., Beaudoin, F., Fraser, T., Stobart A.K., Napier, J.A. and Lazarus C.M. (2002). Identification of a cDNA encoding a novel C18-Delta(9) polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. *FEBS Lett.* 510(3):159-165.

Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J.A., Stobart, A.k. and Lazarus, C.M. (2004). Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nat. Biotechnol.* 22(6):739-745.

Qiang, H., Zhengyu, H., Cohen, Z. and Richmond, A. (1997). Enhancement of eicosapentaenoic acid (EPA) and γ -linolenic acid (GLA) production by manipulating algal density of outdoor cultures of *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta) and *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *Eur. J. Phycol.* 32:81-86.

Qiu, X. (2003). Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4,7,10,13,16,19): two distinct pathways. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 68:181-186.

Qiu, X., Hong, H. and MacKenzie, S.L. (2001). Identification of a $\Delta 4$ Fatty Acid Desaturase from *Traustochytrium* sp. Involved in the Biosynthesis of Docosahexaenoic Acid by Heterologous Expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *J. Biol. Chem.* 276:31561-31566.

Radwan, S.S. (1991). Sources of C20- polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35(4):421-430.

Raghu, B. and Venkatesan, P. (2008). Effect of n-3 fatty acid supplementation on blood glucose, lipid profile and cytokines in humans: a pilot study. *Indian J. Clin. Biochem.* 23(1):85-88.

Ramírez Fajardo, A.R., Akoh, C.C. and Lai, O.M. (2003). Lipase-Catalyzed Incorporation of n-3 into Palm Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80(12):1197-1200.

Ramírez Fajardo, A.R., Cerdán, L.E., Medina, A.R., Fernández, F.G.A., Moreno, P.A.G and Grima, E.M. (2007). Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109(2):120-126.

Ramírez Fajardo, A.R., Cerdán, L.E., Medina, A.R., Martínez, M.M.M., Peña, E.H. and Grima, E.M. (2006). Concentration of Eicosapentaenoic Acid by Selective Esterification Using Lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83(3):215-221.

Ratledge, C. (1993). Single cell oils – have they a biotechnological future? *Trends Biotechnol.* 11(7):278-284.

Ratledge, C. (1997). Microbial Lipids in: *Biotechnology*, edited by H.J. Rehm and G. Reed, 2nd ed, VCH Germany, vol 7, pp. 133-197.

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

Ratledge, C. (2003). Single Cell Oils in the 21st Century, 94th AOCS Annual Meeting & Expo, May 4-7, Kansas City, Missouri, USA.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807-815.

Ratledge, C. (2005). Single Cell Oils for the 21st Century, in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp. 1-20.

Ratledge, C. Streekstra, H, Cohen, Z. and Fichtali, J. (2005). Down-Stream Processing, Extraction, and Purification of Single Cell Oils in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp. 202-219.

Ratledge, C., Anderson, A.J. and Kanagachandran, K. (2003). Method of Culturing *Cryptocodinium cohnii*. UK Patent 2377455 A.

Ratledge, C., Anderson, A.J., Kanagachandran, K., Grantham, D.J., Stephenson, J.C., de Swaaf, M.E. and Sijtsma, L. (2001b). Culture of *Cryptocodinium cohnii* for the synthesis of a polyunsaturated fatty acid. WO 01/04338 A1.

Ratledge, C., Kanagachandran, K., Anderson, A.J., Grantham, D.J. and Stephenson, J.C. (2001a). Production of Docosahexaenoic Acid by *Cryptocodinium cohnii* Grown in a pH-Auxostat Culture with Acetic Acid as Principal Carbon Source. *Lipids* 36(11):1241-1246.

Ratnayake, W.M.N., Olsson, B., Matthews, D. and Ackman, R.G. (1988). Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oils via Urea Complexation. *Fett Wiss. Technol.* 90:381-386.

Rawn, J.D. (1989). Fatty acid metabolism in: *Biochemistry*, Neil Patterson Publishers, USA, pp. 421-455.

Reis, A.J.D. (2003). Produção integrada de metabolitos com interesse comercial a partir de cianobactérias produzidas em diversos fotobioreactores. Tese de Doutorado, I.S.T., Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Renaud, S.M., Zhou, H.C., Parry, D.L., Thinh, L.-V. and Woo, K.C. (1995). Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochysis* sp. (clone T.ISO). *J. Appl. Phycol.* 7:595-602.

Richmond, A.E. (1986). Cell response to environmental factors in: *Handbook of Microalgal Mass Culture*, CRC Press, pp. 69-97.

Richmond, A.E. (1986). Microalgal culture. *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 4(4): 369-438.

Rissanen, T., Voutilainen, S., Nyysönen, K., Lakka, T.A. and Salonen, J.T. (2000). Fish Oil-Derived Fatty Acids, Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid, and The Risk of Acute Coronary Events. *Circulation* 102:2677-2679.

Rizzo, P.J. (2002). Those amazing dinoflagellate chromosomes. *Cell Res.* 13(4):215-217.

Roberts, L.J., Montine, T.J., Markesbery, W.R., Tapper, A.R., Hardy, P., Chemtob, S., Dettbarn, W.D. and Morrow J.D. (1998). Formation of Isoprostane-like Compounds (Neuroprostanes) *in Vivo* from Docosahexaenoic Acid. *J. Biol. Chem.* 273(29):13605-13612.

Robles Medina A., Esteban Cerdán, L., Giménez Giménez, A., Camacho Páez, B., Ibáñez González, M.J. and Molina Grima, E. (1999). Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *J. Biotechnol.* 70:379-391.

Robles Medina A., Giménez Giménez, A., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J.A., Molina Grima, E. and Contreras Gómez, A. (1995a). Concentration and Purification of Stearidonic, Eicosapentaenoic, and Docosapentaenoic Acids from Cod Liver Oil and the Marine Microalga *Isochrysis galbana*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72(5):575-583.

Robles Medina A., Molina Grima, E., Giménez Giménez, A. and Ibáñez González, M.J. (1998). Downstream Processing of Algal Polyunsaturated Fatty Acids. *Biotechnol. Adv.* 16(3):517-580.

Robles Medina, A., Giménez Giménez, A., Molina Grima, E. and Garcia Sanchez J.L. (1995b). Obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados por el método de los compuestos de inclusión de urea. *Grasas Aceites* 46(3):174-182.

Roche, H.M. (1999). Unsaturated fatty acids. *P. Nutr. Soc.* 58:397-401.

Rols, J.L., Condoret, J.S., Fonade, C. and Goma, G. (1990). Mechanism of Enhanced Oxygen Transfer in Fermentation Using Emulsified Oxygen-vectors. *Biotechnol. Bioeng.* 35:427-435.

Rols, J.L. and Goma, G. (1991). Enhanced oxygen transfer rates in fermentation using soybean oil-in-water dispersions. *Biotechnol. Lett.* 13(1):7-12.

Roperó, S.R. (2003). Dessaturases de membrana: estudis mecánístics, clonatge I aplicacions biotecnològiques, Tesi doctoral, Universitat de Barcelona, pp.354.

Roseiro, J.C., Costa, D.C. and Amaral-Collaço, M.T. (1992). Batch and Fed-batch Cultivation of *Xanthomonas campestris* in Carob Extracts. *Leben. Wiss. Technol.* 25:289-293.

Rubin, D. (2004). Method for preparing pure EPA and pure DHA. US Patent 2004/0236128 A1.

Rusing, M. and Luy, M. (2007). Method for the cultivation of microorganisms of the genus *Thraustochytriales* by using an optimized low salt medium. US Patent 2007/0054384 A1.

Russell, N.J. and Nichols, D.S. (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria – a dogma rewritten. *Microbiology* 145:767-779.

Ruxton, C.H.S., Calder, P.C., Reed, S.C. and Simpson, M.J.A. (2005). The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutr. Res. Rev.* 18:113-129.

Rychkov, G.Y., Litjens, T., Roberts, M.L. and Barritt, G.J. (2005). Arachidonic acid inhibits the store-operated Ca^{2+} current in rat liver cells. *Biochem. J.* 385:551-556.

Sakamoto, T. and Murata, N. (2002). Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:206-210.

Salem, N., Wegher, B., Mena, P. and Uauy, R. (1996). Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:49-54.

Salonen, J.T., Seppänen, K., Nyyssönen, K., Korpela, H., Kauhanen, J., Kantola, M., Tuomilehto, J., Esterbauer, H., Tatzber, F. and Salonen, R. (1995). Intake of Mercury From Fish, Lipid Peroxidation, and the Risk of Myocardial Infarction and Coronary, Cardiovascular, and Any Death in Eastern Finnish Men. *Circulation* 91:645-655.

Sampath, H. and Ntambi, J.M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 25:317-40.

Sanchez-Puerta, M.V., Lippmeier, J.C., Apt, K.E. and Delwiche, C. F. (2007). Plastid Genes in a Non-Photosynthetic Dinoflagellate. *Protist* 158:105-117.

Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. and Estevez, A. (1999a). Recent developments in essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177:191-199.

Sargent, J., McEvoy, Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. and Tocher, D. (1999b). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179:217-229.

Sargent, J.R.S. (2001). What will happen when the demand for fish oil will exceed supply within ten years? *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 103(11):711-711.

Sato, K., Kigawa, T., Ueno, S., Gotoh, N. and Wada, S. (2009). Polymorphic Behavior of Structured Fats Including Stearic Acid and ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86:297-300.

Schaefer, E.J., Bongard, V., Beiser, A.S., Lamon-Fava, S., Robins, S.J., Au, R., Tucker, K.L., Kyle, D.J., Wilson, P.W.F. and Wolf, P.A. (2006). Plasma Phosphatidylcholine Docosahexaenoic Acid Content and Risk of Dementia and Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.* 63:1545-1550.

Schiller, J. (1993). Dinoflagellate (Peridineae) in monographischer Behandlung in: Kolkwitz R(ed) Rabenhorst's Kryptogamenflora 10(3), 2nd edn. Akad Verlag, Leipzig.

Schlenk, H. (1961). Crystallization of fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38:728-736.

Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A.V., Witke, W., Huttner, W.B. and Söling, H.D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401(6749):133-141.

Scholfield, C.R. (1979). Silver Nitrate-High Performance Liquid Chromatography of Fatty Methyl Esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, April, 510-511.

Scrimgeour, C. (2005). Chemistry of Fatty Acids, in: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, sixth Edition-Edited by Fereidoon Shahidi, John Wiley & Sons, Inc. pp. 1-43.

Seligo, A. (1885). Untersuchungen über Flagellaten. *Bietraege Biol. Pflanzen* 4:145-180.

Senanayake, S.P.J.N. and Shahidi, F. (2000). Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) from algal oil via urea complexation. *J. Food Lipids* 7(1):51-61.

Senanayake, S.P.J.N. and Shahidi, F. (2007). Acidolysis of Seal Blubber Oil with Lauric Acid. *J. Food Lipids* 14:78-96.

Serhan, C.N. (2006). Resolvins and protectins: novel lipid mediators in anti-inflammation and resolution. *Scand. J. Food Nutr.* 50(S2):68-78.

Serhan, C.N., Arita, M., Hong, S. and Gotlinger, K. (2004). Resolvins, Docosatrienes, and Neuroprotectins, Novel Omega-3-Derived Mediators, and Their Endogenous Aspirin-Triggered Epimers. *Lipids* 39(11):1125-1132.

Serrade, S.J., Rios, G.M. and Carlès, M. (1998). Supercritical CO₂ extraction coupled with nanofiltration separation applications to natural products. *Separ. Sci. Technol.* 14:19-25.

Shahidi, F. and Wanasundara, N. (1998). Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends Food Sci. Technol.* 9:230-240.

Shanta, N.C. and Ackman, R.G. (1991). Silica gel thin-layer chromatographic method for concentration of longer-chain polyunsaturated fatty acids from food and marine lipids. *Can. Inst. Sci. Technol. J.* 24:156-160.

Shimada, Y., Sakai, N., Sugihara, A., Fujita, H., Honda, Y. and Tominaga, Y. (1998). Large-Scale Purification of γ -Linolenic Acid by Selective Esterification Using *Rhizopus delemar* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(11):1539-1544.

Shimada, Y., Maruyama, K., Okasaki, S., Nakamura, M. and Sugihara, A. (1994). Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids with *Geotrichum candidum* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71(9):951-954.

Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Kuramoto, T., Nagao, T., Gemba, M. and Tominaga, Y. (1997). Purification of Docosahexaenoic Acid by Selective Esterification of Fatty Acids from Tuna Oil with *Rhizopus delemar* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74(2):97-101.

Sijtsma, L. and de Swaaf, M.E. (2004). Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *App. Microbio. Biotechnol.* 64:146-153.

Sijtsma, L., Anderson, A.J. and Ratledge, C. (2005). Alternative Carbon Sources for Heterotrophic Production of Docosahexaenoic Acid by Marine Alga *Cryptocodinium*

cohnii in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp.107-123.

Sijtsma, L., Springer, J., Meesters, P.A., de Swaaf, M.E. and Enggink, G. (1998). Recent advances in fatty acids synthesis in oleaginous yeasts and microalga. *Recent Res. Dev. Microbiol.* 2:219-232.

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

Simopoulos A.P. (2001b). The Mediterranean Diets: What Is SO Special about the Diet of Greece? The Scientific Evidence. *J. Nutr.* 131(11):3065S-3073S.

Simopoulos, A.P. (1999a). Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70(suppl):560S-569S.

Simopoulos, A.P. (1999b). New Products from the Agri-Food Industry: The Return of n-3 Fatty Acids into Food Supply. *Lipids* 34:S297-S301.

Simopoulos, A.P. (2000). Human Requirement for n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. Symposium: Role of Poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA. *Poultry Sci.* 79:961-970.

Simopoulos, A.P. (2001a). Evolutionary aspects of diet, essential fatty acids and cardiovascular disease. *Eur. Heart J. Suppl.*3 (Supplement D):D8-D21.

Simopoulos, A.P. (2001c). n-3 Fatty Acids and Human Health: Defining Strategies for Public Policy. *Lipids* 36:S83-S89.

Simopoulos, A.P. (2001d). Evolutionary Aspects of Diet and Essential Fatty Acids in: *Fatty Acids and Lipids New Findings*, World Rev. Nutr. Diet. Basel, Karger, vol. 88, pp.18-27.

Simopoulos, A.P. (2002a). Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21(6):495-505.

Simopoulos, A.P. (2002b). The importance of the ratio omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56(8):365-379.

Simopoulos, A.P. (2003a). Omega-3 Fatty Acids and Cancer. *Indoor Built Environ.* 12(6):405-412.

Simopoulos, A.P. (2003b). The Importance of the Ratio of Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acids Evolutionary Aspects in: *Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio The Scientific Evidence*, Karger AG, Basel, Switzerland, pp. vii-xiii.

Simopoulos, A.P. (2004). Omega-6/omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases. *Food Rev. Int.* 20(1): 77-90.

Simopoulos, A.P. (2006a). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.* 60:502-507.

Simopoulos, A.P. (2006b). Evolutionary Aspects of Diet, the Omega-6/Omega-3 Ratio, and Gene Expression in: *Phytochemicals: Nutrient-Gene Interactions*, CRC Press, Boca Raton, pp.137-159.

Simopoulos, A.P. (2008a). The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation and cardiovascular disease. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17(S1):131-134.

Simopoulos, A.P. (2008b). The Importance of Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Exp. Biol. Med.* 233(6):674-688.

Simopoulos, A.P., Leaf, A. and Salem, N. (1999). Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *J. Am. Coll. Nutr.* 18(5):487-489.

Sinclair, A., Attar-Bashi, N., Jayasooriya, A., Gibson, R. and Makrides, M. (2005). Nutritional Aspects of Single Cell Oils: Uses and Applications of Arachidonic Acid and Docosahexaenoic Acid in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA pp.182-201.

Sinclair, A.J., McLean, J.G. and Monger, E.A. (1979). Metabolism of linoleic acid in the cat. *Lipids* 14(11):932-936.

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

Singh, A., Wilson, S. and Ward, O.P. (1996). Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892. *World J. Microb. Biot.* 12(1):76-81.

Singh, M. (2008). Essential Fatty Acids, DHA and Human Brain. *Indian J. Pediatr.* 72(3):239-242.

Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K. and Dallner, G. (1991). Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 26(6):421-425.

Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Srividya, C., Krishnanand, Sambaiah, K. and Lokesh, B.R. (2001). Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures. *World J. Microb. Biot.* 17:317-320.

Sournia, A. (1986). Atlas du Phytopancton marin. Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidophycées (vol. 1). Edition du CNRS, Paris.

Spector D.L. (1984). Dinoflagellate, Academic Press, New York, USA.

Sperling, P., Ternes, P., Zank, T.K. and Heinz, E. (2003). The evolution of desaturases. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 68:73-95.

Spinelli, J., Stout, V.F. and Nilsson, W.B. (1987). Purification of fish oils. U.S. Patent 4,692,280.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101(2):87-96.

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

Sprecher, H., Chen, Q. and Yin, F.Q. (1999). Regulation of the Biosynthesis of 22:5n-6 and 22:6n-3: A Complex Intracellular Process. *Lipids* 34:S153-S156.

Sprecher, H., Luthria, D.L., Mohamed, B.S. and Baykousheva, S.P. (1995). Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 36:2471-2477.

Stanbury, P.F. and Whitaker, A. (1984). Aeration and Agitation in: *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press, Headington Hill Hall, Oxford, England, pp. 169-192.

Starr R.C., Zeikus, J.A (1993). UTEX – the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29(suppl):90-95.

Storddy, B.J. (2000). Dark adaptation, motor skills, docosahexaenoic acid, and dyslexia. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(suppl):323S-326S.

Stout, V.F. and Spinelli, J. (1987). Polyunsaturated fatty acids from fish oils. U.S. Patent 4,675,132.

Stryer, L. (1988). Metabolismo de Ácidos Graxos in: *Bioquímica*, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, pp.387-401.

Sukenik, A. (1991). Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresource Technol.* 35(3):263-269.

Surette, M.E. (2008). The science behind dietary omega-3 fatty acids. *Can. Med. Assoc. J.* 178(2):177-180.

Swern, D. and Parker, W.E. (1953). Application of Urea Complexes in the Purification of Fatty Acids Esters, and Alcohols. III. Concentrates of Natural Linoleic and Linolenic Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 30:5-7.

Takeuchi, D., Uehara, K. and Lizuka, T. (1994). Processes for culturing marine microalgae and producing docosahexaenoic acid using the same, Kawasaki Steel Corporation. E Patent 0622463 A2.

Tanaka M., Ueno, A., Kawasaki, K., Yumoto, I., Ohgiya, S., Hoshino, T., Ishizaki, K., Okuyama, H., and Morita, N. (1999). Isolation of clustered genes that are notably homologous to the eicosapentaenoic acid biosynthesis gene cluster from docosahexaenoic acid-producing bacterium *Vibrio marinus* strain MP-1. *Biotechnol. Lett.* 21: 939-945.

Tanaka, S., Toshiaki, Y., Sakaru, S., Tsutomu, S. and Shigeaki, F. (2007). Process for preparing docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid. E Patent 1785492 A2.

Tanaka, Y. and Ohkubo, T. (2003). Extraction of Lipids from Salmon Roe with Supercritical Carbon Dioxide. *J. Oleo Sci.* 52(6):295-301.

Tanaka, Y., Hirano, J. and Funada, T. (1992). Concentration of Docosahexaenoic Acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69(12):1210-1214.

Tanaka, Y., Skari, I. and Ohkubo, T. (2004). Extraction of Phospholipids from Salmon Roe with Supercritical Carbon Dioxide and an Entrainer. *J. Oleo Sci.* 53(9):417-424.

Teixeira, J.A., Vicente, A.A, and Belo, I. (2007). Transferência de massa in: *Reactores Biológicos Fundamentos e Aplicações*, Lidel edições técnicas lda, Lisboa, Portugal, pp.103-124.

Thelen, J.J. and Ohlrogge, J.B. (2002) Metabolic engineering of fatty acids biosynthesis in plants. *Metab. Eng.* 4(1):12-21.

Timms, R.E. (2005). Fractional crystallisation- the fat modification process for the 21st century. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 107(1):41-57.

Tocher, D.R., Webster, A. and Sargent J.R. (1986). Utilization of porcine pancreatic phospholipase A2 for the preparation of a marine fish oil enriched in (n-3) polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8(1):83-95.

Tocher, D.R., Leaver, M.J., and Hodgson, P.A. (1998). Recent Advances in the biochemistry and molecular Biology of Fatty Acyl Desaturases. *Prog. Lipid Res.* 37 (2/3): 73-117.

Tocher, D.R. and Ghioni, C. (1999). Fatty Acid Metabolism in marine Fish: Low Activity of Fatty Acyl $\Delta 5$ Desaturation in Gilthead Sea Bream (*Sparatus aurata*) Cells. *Lipids* 34(5): 433-439.

Tonon, T., Harvey, D. Larson, T.R. and Graham, I.A. (2002). Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61:15-24.

Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R. and Graham I.A. (2003). Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid Delta4-desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*. *FEBS Lett.* 553(3):440-444.

Torkko, J. (2003). Characterization of mitochondrial 2-enoyl thioester reductase involved in respiratory competence. Unversersity of Oulu, Finland, ISBN 951-42-7031-2, pp.16-34.

Torrejon, C., Jung, U.J. and Deckelbaum R.J. (2007). n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: Actions and molecular mechanisms. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 77(5):319-326.

Traitler, H., Wille, H.J. and Studer A. (1988). Fractionation of Blackcurrant Seed Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65(5):755-760.

Trautwein, E.A. (2001). n-3 fatty acids- physiological and technical aspects for their use in food. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103:45-55.

Tuttle, R.C. and Loeblich, A.R. (1974a). The discovery of genetic recombination in dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *J. Phycol.* 10:16S.

Tuttle, R.C. and Loeblich, A.R. (1974b). Genetic Recombination in dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Science* 185:1061-1062.

Tuttle, R.C. and Loeblich, A.R. (1975). An Optimal growth medium for the dinoflagellate. *Cryptocodinium cohnii*. *Phycologia* 14(1):1-8.

Uauy, R. and Peirano, P. (1999). Breast is best: human milk is the optimal food for brain development. *Am. J. Clin. Nutr.* 70:433-434.

Uauy, R., Mena, P., Wegher, B., Nieto, S. and Salem, N. (2000). Long chain polyunsaturated fatty acid formation in neonates: effect of gestational age and intrauterine growth. *Pediatr. Res.* 47(1):127-135.

Ucko, M., Cohen, S., Gordin, H. and Arad, S. (1989). Relationship between the unicellular red microalga *Porphyridium* sp. and its predator, the dinoflagellate *Gymnodinium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2990-2994.

Ucko, M., Elbrächter, M. and Schnepf, E. (1997). A *Cryptocodinium cohnii*-like dinoflagellate feeding myzocytotically on unicellular red alga *Porphyridium* sp. *Eur. J. Phycol.* 32:133-140.

Ucko, M., Geresh, S., Simon-Berkovitch, B. and Arad (Malis), S. (1994). Predation by a dinoflagellate on a red microalga with cell wall modified by sulphate and nitrate starvation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 104:293-298.

Ucko, M., Shrestha, R.P. and Mesika, P. (1999). Glycoprotein moiety in the cell wall of the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta) as the biorecognition site for the *Cryptothecodinium cohnii*-like dinoflagellate. *J. Phycol.* 35:1276-1281.

Unagul, P., Assantachai, C., Phadungruengluij, S., Pongsuteeragul, T., Suphantharika, M. and Verduyn, C. (2006). Biomass and docosahexaenoic acid formation by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02 at low salt concentrations. *Bot. Mar.* 49:182-190.

Unagul, P., Assantachai, C., Phadungruengluij, S., Suphantharika, M. and Verduyn, C. (2005). Properties of the docosahexaenoic acid-producer *Schizochytrium mangrovei* Sk-02: effects of glucose, temperature and salinity and their interaction. *Bot. Mar.* 48(5/6):387-394.

Valenzuela, A. and Nieto, M.S. (2001). Acido docosahexaenoico (DHA) en el desarrollo fetal y en la nutrición materno-infantil. *Rev. Méd. Chile* 129(10):1203-1211.

Van Gelder, B.M., Tijhuis, M., Kalmijn, S. and Kromhout, D. (2007). Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(4):1142-1147.

Van Pelt, C.K., Huang, M.-C., Tschanz, C.L. and Brenna, J.T. (1999). An octaene fatty acid, 4,7,10,13,16,19,22,25-octacosaoctaenoic acid (28:8n-3), found in marine oils. *J. Lipid Res.* 40:1501-1505.

Vazhappilly, R. (1999). Effects of environmental factors and desaturase inhibitors on the formation of docosahexaenoic acid by *Cryptothecodinium cohnii* strains under heterotrophic growth conditions. Doctoral thesis, University of Hong-Kong, China.

Vazhappilly, R. and Chen, F. (1998). Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Production Potential of Microalgae and Their Heterotrophic Growth. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(3):393-397.

Voet, D., Voet, J.G. and Pratt, C.W. (1999). Lipid Metabolism in: *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp.562-610.

Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S. and Sprecher, H. (1991). The metabolism of 7,10,13,16,19-Docosapentaenoic Acid to 4,7,13,16,19-Docosahexaenoic Acid in Rat Liver Is Independent of 4-Desaturase. *J. Biol. Chem.* 266(30):19995-20000.

Wada, H., Compos, Z. and Murata, N. (1990). Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature* 347:200-203.

Wallis, J.G. and Browse, J. (1999). The Delta-8-desaturase of *Euglena gracilis*: an alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 365(2):307-316.

Wallis, J.G. and Browse, J. (2002). Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Prog. Lipid Res.* 41(3):254-78.

Wallis, J.G., Watts, J.L. and Browse, J. (2002). Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem. Sci.* 27(9):467-473.

Walton, A.J.E., Snaith, M.L., Locniskar, M., Cumberland, A.G., Morrow, W.J.W. and Isenberg, D.A. (1991). Dietary fish oil and the severity of symptoms in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 50:463-466.

Wanasundara, U.N. and Shahidi, F. (1998a). Lipase-Assisted Concentration of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Acylglycerols from Marine Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(8):945-951.

Wanasundara, U.N. and Shahidi, F. (1998b). Concentration of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Oils Using *Candida cylindracea* Lipase: Optimization of Reaction Conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(12):1767-1774.

Wanasundara, U.N. and Shahidi, F. (1999). Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. *Food Chem.* 65:41-49.

Wanasundara, U.N., Wanasundara, J. and Shahidi, F. (2002). Omega-3 fatty acid concentrates: a review of production technologies in *Seafoods: Quality, Technology, and Nutraceutical Applications*, Cesarettin Alasalvar, Tony Taylor pp.157-174.

Wang, C., Harris, W.S., Chung, M., Lichtenstein, A.H., Balk, E.M. and Kupelnick, B. (2006). n-3 fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary – and secondary – prevention studies: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* 84:5-17.

Wang, Z. (2003). Role of redox state modulation of ion channel function by fatty acids and phospholipids. *Brit. J. Pharmacol.* 139:681-683.

Ward, O.P. (1995). Microbial production of long-chain PUFAs. *IMFORM* 6(6):683-688.

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

Weete, J.D., Kim, H., Gandhi, S.R., Wang, Y. and Dute, R. (1997). Lipids and Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185. *Lipids* 32(8):839-845.

Weil, J.H. (2000a). Estrutura dos lípidos in: *Bioquímica Geral*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, pp. 296-320.

Weil, J.H. (2000b). Metabolismo dos lípidos in: *Bioquímica Geral*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, pp. 321-373.

Wen Z.-Y. and Chen, F. (2000a). Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Biotechnol. Lett.* 22:727-733.

Wen, Z. and Chen, F. (2005). Prospects for Eicosapentaenoic Acid Production Using Microorganisms in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp. 138-160.

Wen, Z.-Y. and Chen, F. (2000b). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 25:218-224.

Wen, Z.-Y. and Chen, F. (2001a). Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Enzyme Microb. Technol.* 29:341-347.

Wen, Z.-Y. and Chen, F. (2001b). Optimization of nitrogen sources for the production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis* in heterotrophic cultures in: *Algae and their biotechnological potential*, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, pp.55-68.

Wen, Z.-Y., and Chen, F. (2002). Perfusion culture of the diatom *Nitzschia laevis* for ultra-high yield of eicosapentaenoic acid. *Process Biochem.* 38:523-529.

Wen, Z.-Y. and Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol. Adv.* 21:273-294.

Wen, Z.-Y., Jiang, Y. and Chen, F. (2002). High cell density culture of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: fed-batch development. *Process Biochem.* 37:1447-1453.

Wijesundera, C., Ceccato, C. Watkins, P., Fegan, P., Fraser, B., Thienthong, N. and Perlmutter, P. (2008). Docosahexaenoic Acid is More Stable to Oxidation when Located at the *sn*-2 Position of Triacylglycerol Compared to *sn*-1(3). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85:543-548.

Wille, H.J., Traitler, H. and Kelly, M. (1987). Production of polyenoic fish oil fatty acids by combined urea fractionation and industrial scale preparative HPLC. *Revue Française des corps gras* 34:69-73.

Williams, C.M. and Burdge G. (2006). Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc. Nutr. Soc.* 65(1):42-50.

Wisniak, J. and Korin, E. (2005). Supercritical Fluid Extraction of Lipids and Other Materials from Algae in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp.220-238.

Withers, N.W. and Tuttle, R.C. (1979). Carotenes from Mutants of the dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 26(1):135-138.

Withers, N.W., Tuttle, R.C., Holz, G.G., Beach, D.H., Goad L.J. and Goodwin, T.W. (1978). Dehydrodinosterol, dinosterona and related sterols of a non-photosynthetic dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. *Phytochemistry* 17:1987-1989.

Wong, J.T.Y. and Whiteley, A. (1996). An improved method of cell synchronisation for heterotrophic dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Biecheler analysed flow Cytometry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 197:91-99.

Wood, B.J.B, Grimson, P.H.K., Germanan, J.B. and Turner, M. (1999). Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *J. Biotechnol.* 70: 175-183.

World Health Organization, Food And Agriculture Organization (2002). Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. http://www.who.int/hpr/NPH/docs/who_fao_expert_report.pdf (consultado em 15 Novembro 2009)

Wright, S.W., Kuo, E.Y. and Corey, E.J. (1987). An effective process for the isolation of docosahexaenoic acid in quantity from cod liver oil. *J. Org. Chem.* 52:4399-4401.

Wu, S.-T., Yu, S.-T. and Lin, L.-P. (2005). Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.31. *Process Biochem.* 40:3103-3108.

Wynn, J., Behrens, P., Sundararajan, A., Hansen, J. and Apt, K. (2005). Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates in: *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp. 87-98.

Wynn, J.P. and Ratledge, C. (2006). Microbial Production of Oils and Fats in: *Food Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 443-472.

Wynn, J.P., Hamid, A.A., Li, Y. and Ratledge, C. (2001). Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology* 147:2857-2864.

Yadwad, V.B., Ward, O.P. and Noronha, L.C. (1991). Application of Lipase to Concentrate the Docosahexaenoic Acid (DHA) Fraction of Fish Oil. *Biotechnol. Bioeng.* 38:956-959.

Yaguchi, T., Tanaka, S., Yokochi, T., Nakahara, T. and Higashihara, T. (1997). Production of High Yields of Docosahexaenoic Acid by *Shizochytrium* sp. Strain SR21. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74(11):1431-1434.

Yamagouchi, K. Murakami, M., Nakano, H., Konusu, S., Kokura, K., Yamamoto, H., Kosaka, M. and Hata, K. (1986). Supercritical carbon dioxide extraction of oils from Antarctic krill. *J. Agric. Food Chem.* 34:904-907.

Yamamura, R. and Shimomura, Y. (1997). Industrial High-Performance Liquid Chromatography Purification of Docosahexaenoic Acid Ethyl Ester and Docosapentaenoic Acid Ethyl Ester from Single-Cell Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74(11):1435-1440.

Yamane, T., Suzuki, T., Sahashi, Y., Vikersveen, L. and Hoshino, T. (1992). Production of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Fish Oil by Lipase-Catalyze Acidolysis without Solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69(11):1104-1107.

Yamasaki, T., Aki, T., Mori, Y., Yamamoto, T., Shinozaki, M., Kawamoto, S. and Ono, K. (2007). Nutritional Enrichment of Larval Fish Feed with *Thaustochytrid* Producing Polyunsaturated Fatty Acids and Xanthophylls. *J. Biosci. Bioeng.* 104(3):200-206.

Yamasaki, T., Aki, T., Shinozaki, M., Taguchi, M., Kawamoto, S. and Ono, K. (2006). Utilization of *Shochu* Distillery Wastewater for Production of Polyunsaturated Fatty Acids and Xanthophylls Using *Thraustochytrid*. *J. Biosci. Bioeng.* 102(4):323-327.

Yang, C.X., Takezaki, T., Hirose, K., Inoue, M. Huang, X.E. and Tajima, K. (2003). Fish consumption and colorectal cancer: a case-reference study in Japan. *Eur. J. Cancer Prev.* 12(2):109-115.

Yap, C.Y. and Chen, F. (2001). Polyunsaturated Fatty Acids: Biological Significance, Biosynthesis and Production by Microalgae and Microalgae-like Organisms in: *Algae and their Biotechnological Potential*, Kluwer Academic Publishers, pp. 1-32.

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

Yokochi, T., Nakahara, T., Higashihara, T., Tanaka, S. and Yaguchi, T. (2003). Microorganisms capable of producing highly unsaturated fatty acids and process for producing highly unsaturated fatty acids by using the microorganisms. US Patent 6,582,941 B1.

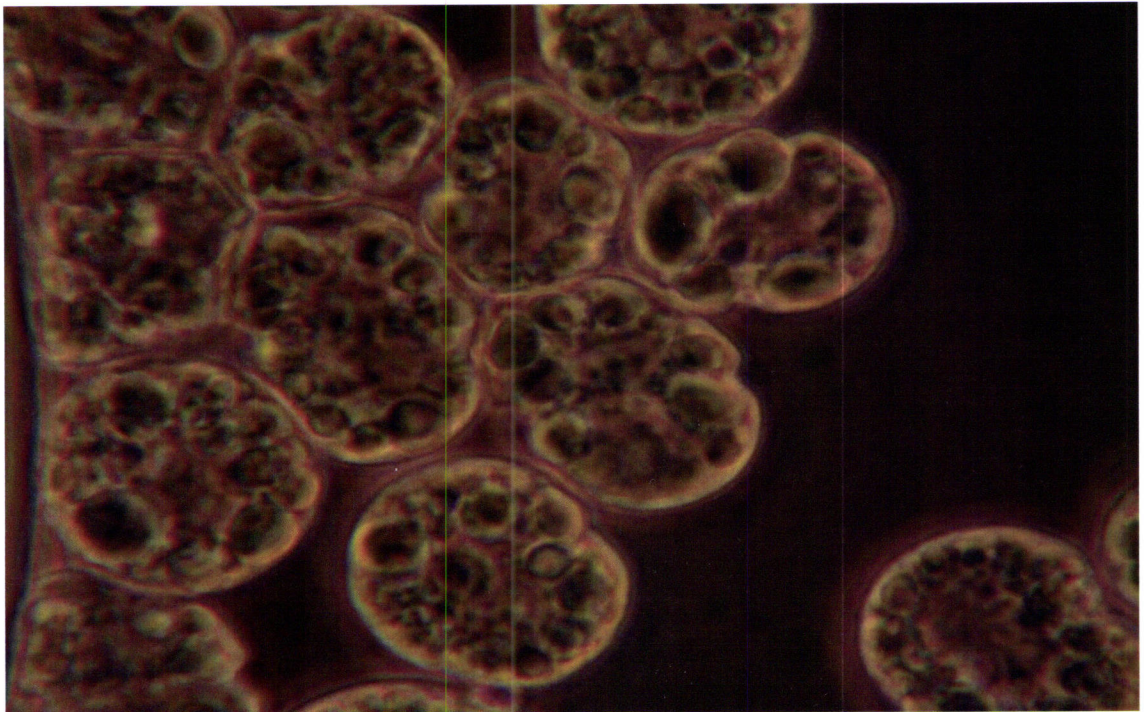
Yokochi, T., Usita, M.T., Kamisaka, Y., Nakahara, T. and Suzuki, O. (1990). Increase in the γ -Linolenic Acid Content by Solvent Winterization of the Fungal Oil Extracted from *Mortierella* Genus. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67(11):846-851.

Yongmanitchai, W. and Ward, O.P. (1989). Omega-3 Fatty Acids: Alternative Sources of Production. *Process Biochem.* 117-125.

- Yongmanitchai, W. and Ward, O.P. (1991). Growth of and Omega-3 Fatty Acid Production by *Phaeodactylum tricornutum* under Different Culture Conditions. *Appl. Environ. Microb.* 57(2):419-425.
- Young, G.S., Conquer J.A. and Thomas, R. (2005). Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:549-558.
- Yuhas, R., Pramuk, K. and Lien, E.L. (2006). Human Milk Fatty Acid Composition from Nine Countries Varies Most in DHA. *Lipids* 41(9):851-858.
- Zhang, J. Sasaki, S., Amado, K. and Kesteloot H. (1999). Fish Consumption and Mortality from All Causes, Ischemic Heart Disease, and Stroke: an Ecological Study. *Prev. Med.* 28(5):520-529.
- Zhao, S., Kuttuva, S.G. and Ju, L.-K. (1999). Oxygen transfer characteristics of multiple-phase dispersions simulating water-in-oil xanthan fermentations. *Bioprocess Eng.* 20:313-323.
- Zhu, L., Zhang, X., Ren, X. and Zhu, Q. (2008). Effects of Culture Conditions on Growth and Docosahexaenoic Acid Production from *Schizochytrium limacinum*. *J. Ocean Univ. Chin.* 7(1):83-88.
- Zhu, M., Zhou, P.P., and Yu, L.J. (2002). Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technol.* 84(1):93-95.
- Zuta, C.P., Simpson, B.K., Chan, H.M. and Phillips, L. (2003). Concentrating PUFA from Mackerel Processing Waste. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80(9):933-936.
- Zuta, P.C., Simpson, B.K., Zhao, X. and Leclerc, L. (2007). The effect of α -tocopherol on oxidation of mackerel oil. *Food Chem.* 100(2):800-807.

CHAPTER 3

Study of the DHA Production by the Heterotrophic Microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using Carob Pulp as Promising carbon Source



Cryptocodinium cohnii (Seligo) CCMP 316. Ampliação (× 1000)

Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source

Ana Mendes · Pedro Guerra · Vânia Madeira ·
Francisco Ruano · Teresa Lopes da Silva ·
Alberto Reis

Received: 30 October 2006 / Accepted: 22 December 2006 / Published online: 24 January 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract In this work, carob pulp syrup was used as carbon source in *C. cohnii* fermentations for docosa-hexaenoic acid production. In preliminary experiments different carob pulp dilutions supplemented with sea salt were tested. The highest biomass productivity (4 mg/lh) and specific growth rate (0.04/h) were observed at the highest carob pulp dilution (1:10.5 (v/v), corresponding to 8.8 g/l glucose). Ammonium chloride and yeast extract were tested as nitrogen sources using different carob pulp syrup dilutions, supplemented with sea salt as growth medium. The best results were observed for yeast extract as nitrogen source. A *C. cohnii* fed-batch fermentation was carried out using diluted carob pulp syrup (1:10.5 v/v) supplemented with yeast extract and sea salt. The biomass productivity was 420 mg/lh, and the specific growth rate 0.05/h. Under these conditions the DHA concentration and DHA production volumetric rate attained 1.9 g/l and 18.5 mg/lh respectively after 100.4 h. The easy, clean and safe handling of carob pulp syrup makes this feedstock a promising carbon source for large-scale DHA production from *C. cohnii*. In this way, this carob industry by-product could be usefully disposed of through microbial production of a high value fermentation product.

Keywords Carob pulp syrup · DHA · Microalga *Cryptocodinium cohnii* · Omega-3 polyunsaturated fatty acid

Introduction

The therapeutic importance of ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) has been demonstrated by extensive clinical and epidemiological studies. Docosa-hexaenoic acid (DHA), along with eicosapentaenoic acid (EPA) which are the most important ω -3 PUFAs, are known to provide the health benefits associated with the consumption of certain marine fish and their oils. DHA accumulates in the membranes of human nervous, visual, and reproductive tissues and is also the most abundant fatty acid in the grey matter of the brain. In addition, DHA is considered to be particularly important in infant nutrition and brain development and it is also involved in anticholesterolaemic and anti-inflammatory activities (Jiang et al. 1999; De Swaaf et al. 2003a). The traditional source of PUFAs, fish oil, is a limited resource and its composition and quality are variable. Moreover, fish oil contains among others large quantities of saturated and ω -6 fatty acids making concentration and purification time-consuming and expensive. The peculiar taste and odor limit the use of fish oil as a source of DHA. Considerable evidence has indicated that ω -3 fatty acids in fish oils actually derive from zooplankton that consume algae. Therefore, microalgae are considered among the most promising sources of DHA.

Attempts have been made to produce DHA photoautotrophically by growing microalgae in photobioreactors, but it is difficult to achieve high biomass concentrations and high DHA productivities. This is due to two unsolved problems, namely light limitation and oxygen accumulation, in photoautotrophic culture (Molina et al. 2001). Heterotrophic growth of microalgae eliminates the requirement for light and so offers

A. Mendes · P. Guerra · V. Madeira · F. Ruano ·
T. Lopes da Silva (✉) · A. Reis
Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação
(INETI), Departamento de Biotecnologia, Unidade de
Bioengenharia e Bioprocessos, Estrada do Paço do Lumiar,
Lisboa 22 1649-038, Portugal
e-mail: teresa.lopesilva@ineti.pt

the possibility of greatly increasing algal cell density and productivity on a large-scale. Screening of microalgae for heterotrophic production potential of DHA is therefore of great significance.

DHA is the characteristic PUFA of the marine dinoflagellates. *Cryptocodinium cohnii* is a non-photosynthetic, heterotrophic marine dinoflagellate in which 16:0 and DHA fatty acids predominate. Usually, nearly 25–60% of its constituent fatty acids is 22:6 (ω -3) fatty acid and no other PUFAs are present in excess of 1% (Tuttle and Loeblich 1975), making DHA separation and concentration easy and cheap. This characteristic makes the DHA production from this micro-organism very attractive particularly for pharmaceutical applications since the inclusion of a PUFA as a drug component requires its purification to over 95% (Ratledge 2004).

To be or remain competitive and to enlarge the application areas, the production costs of microbial DHA have to decrease (De Swaaf and Sijtsma 2004). Growth conditions such as temperature and medium composition have a crucial influence on *C. cohnii* growth and DHA production as the micro-organism usually modify its biochemical composition in response to environmental changes (Jiang and Chen 2000a). The contribution of the culture medium cost to the overall production cost is rather important, as suggested previously by several authors (Borowitzka 1992). In most of the documented commercial cultivation processes, glucose is used as the carbon and energy source, as it represents an easily accessible feedstock for many industrial fermentation processes and is usually obtained in the form of glucose syrups, from the hydrolysis (chemical as well as enzymological) of corn starch (Sijtsma et al. 2005). However, alternative carbon sources such as acetic acid and ethanol for *C. cohnii* growth and DHA production enhancement have been studied (De Swaaf et al. 2003a; De Swaaf et al. 2003b). Despite the high DHA productivities obtained from these feedstocks, acetic acid in large-scale fermentations requires careful handling, as any spillage or contact with the skin must be dealt with promptly. Moreover, high capital investment and maintenance costs should be considered for fermentation hardware when dealing with a corrosive feedstock such as acetic acid. Ethanol flammability makes this feedstock unsuitable when stored and transported around a production site in its undiluted form. In addition, processes using ethanol may need to be continuously scrutinized by regulatory authorities to prevent the use of the ethanol for purposes other than for which it was intended. This may place unwanted restrictions on its suitability as a fermentation feedstock (Sijtsma et al.

2005). Therefore, alternative easy handling carbon sources for *C. cohnii* DHA large-scale production should be found.

The carob tree (*Ceratonia siliqua L.*) is a leguminous plant, which has been widely cultivated in Mediterranean countries for years. The seeds of carob (10% of the fruit dry weight) produce 12% of the world market of gum and are widely used in the food industry. The pulp (the other 90 % of the fruit dry weight) contains high content of sugar (sucrose, glucose and fructose) and tannins and low content of protein and fat, which limits its application as animal feed. However the high sugar content is easily extractable making this material eligible for the production of syrups that can be used as substrate for fermentation (Roseiro et al. 1991; Petit and Pinilla 1995). In this way, this carob industry by-product could be utilized through the production of high value fermentation products.

In the present work carob pulp syrup was used as carbon source in *C. cohnii* fermentations. Preliminary experiments were carried out in order to determine the carob pulp syrup dilution and nitrogen source that allowed the highest DHA production. The best culture formulation was then used in a fed-batch fermentation in order to enhance the DHA production by this marine heterotrophic microalga.

Materials and methods

Organism

Cryptocodinium cohnii CCMP 316 was obtained from the Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) Culture Collection (Maine, USA) and was maintained in axenic conditions by subculturing every two weeks in f/2+NPM medium (Guillard 1960; Guillard and Ryther 1962; Guillard 1975) supplemented with glucose (6 g/l).

Carob pulp syrup extraction

Distilled water was added to carob pulp (1:2 w/w) and the extraction was carried out in an orbital shaker (HT, UK), at 150 rev/min for 6 h at 50°C. The suspension was then pressed and squeezed. The supernatant was filtered and centrifuged at $8900 \times g$ for 20 min at 4°C using an Avanti J-25 I centrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Finally, the liquid fraction was acidified to pH 2 with concentrated sulfuric acid (Merck, Darmstadt, Germany), in order to promote sucrose hydrolysis, and stored at -18°C .

Glucose and fructose concentrations in the initial and diluted carob syrup were determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

Preliminary experiments

Different dilutions (1:10.5 v/v; 1:6.5 v/v and 1:3.25 v/v) of the mother carob pulp syrup were prepared and used as *C. cohnii* growth medium supplemented with 25 g sea salt/l. Nephelometer flasks (250 ml) containing 40 ml of these culture media were inoculated (10% v/v) and incubated at 27°C 120 rev/min, pH 6.5. For each syrup dilution, two different nitrogen sources usually used in *C. cohnii* growth media were tested: 0.05 g of ammonium chloride/l (in order to maintain the molar equivalence with respect to nitrogen concentration of f/2+NPM medium) and 5 g of yeast extract/l (according to De Swaaf et al. 1999). The optical density was followed. The microalgal biomass was harvested at the early stationary phase, centrifuged, freeze-dried and stored at -18°C for further fatty acid analysis. For each syrup dilution, two replicates were carried out.

Bioreactor fermentations

The fermentations were carried out in a cylindro-conical 2–1 fermenter (SGI, Toulouse, France), equipped with one 6-blade Rushton disk turbine. Starting culture volume was 1.25 l. Temperature was kept constant at the optimal growth temperature (27°C) by means of a constant flow from a water bath through the glass cylinder jacket. Sterile air was added at the aeration rate of 1 v/v/m (75 l/h). One drop of silicone (Merck, Darmstadt, Germany) 0.00 5% (w/v) was added as antifoam agent. pH was measured using a steam-sterilizable electrode (Mettler Toledo (Columbus, USA)) being controlled automatically through the addition of 2 M NaOH and 2 M HCl, on demand, to 6.5 ± 0.1 . In order to minimize the viscosity effects caused by extracellular polysaccharides produced by *C. cohnii*, enhancing oxygen mass transfer at the same time, a commercial hydrolytic enzyme Glucanex® (Novozyme, Denmark) was added (0.5 g/l) as previously suggested by de Swaaf et al. (2003a).

Cryptocodinium cohnii sampling was carried out at least three times a day. The culture samples (in duplicate) were centrifuged in a refrigerated centrifuge (Koolspin Burkard Scientific, Uxbridge, UK) and the pellet was freeze-dried and stored under N₂ atmosphere at -18°C for further analysis.

The starting culture medium composition was as follows: sea salt 25 g/l; yeast extract 2 g/l; mother carob syrup 119 ml (in order to assure a 1:10.5 v/v dilution).

The inoculum volume (10% v/v) was previously grown in the same culture medium in order to shorten the lag phase.

The stirring rate (100–600 rev/min) was manually increased whenever the DOT was below 40%. Pulses of diluted carob syrup were added whenever the dissolved oxygen increased above 70%.

Dry cell weight measurements

Cell concentration (optical density) in the nephelometer flask experiments was determined at 540 nm. Cell dry weight was estimated from optical density by a calibration curve.

In fed-batch fermentation, biomass, expressed as dry cell mass, was measured gravimetrically on 5 ml of culture samples (in duplicate), from which cells were harvested and dried for 24 h at 100°C.

Determination of specific growth rate

Specific growth rate was determined by plotting the natural logarithm of biomass concentration against time. Readings within the exponential phase were then used to obtain correct values of the specific growth rate by linear regression (Jiang and Chen 2000b).

Methyl ester preparation and analysis

Fatty acid extraction and preparation of methyl esters were carried out according to Lepage and Roy (1986) with modifications. Freeze-dried samples of *C. cohnii* (100 mg) were transmethylated with 2 ml of methanol/acetyl chloride (95:5 v/v) and 0.2 ml heptadecanoic acid (5 mg/ml, Nu-Check-Prep, Elysian, USA) as internal standard. The mixture was sealed in a light-protected Teflon-lined vial under nitrogen atmosphere and heated at 80°C for 1 h. The vial contents were then cooled, diluted with 1 ml water and extracted with 2 ml of *n*-hexane. The hexane layer was dried over Na₂SO₄, evaporated to dryness under nitrogen atmosphere and redissolved in hexane, which contained the methyl esters. The methyl esters were then analysed by gas-liquid chromatography, on a Varian (Palo Alto, USA) 3800 gas-liquid chromatograph (USA), equipped with a flame ionization detector. Separation was carried out on a 0.32 mm × 30 m fused silica capillary column (film 0.32 μm) SupelCOWAX 10 (SupelCo, Bellafonte, PA, USA) with helium as carrier gas at a flow rate of 3.5 ml/min. The column temperature was programmed at an initial temperature of 200°C for 8 min, then increased at 4°C/min to 240°C and held there for 16 min. Injector and detector temperatures were 250

and 280°C respectively and split ratio was 1:50 for 5 min and then 1:10 for the remaining time. The column pressure was 13.5 psi. Peak identification and response factor calculation were carried out using known standards (Nu-Chek-Prep, Elysian, USA). Each sample was made in duplicate and injected twice.

Results and discussion

Preliminary experiments

Selection of the optimal carob pulp dilution

C. cohnii was able to grow on diluted carob syrup supplemented with sea salt (Fig. 1a, b). The initial glucose and fructose concentrations in the mother carob syrup extract were 92.2 g/l and 73.3 g/l, respectively. The highest biomass concentration (0.4 g/l) was obtained at the highest dilution syrup (1:10.5 v/v) (Fig. 1a). In the syrup dilution range studied, the higher the carob syrup concentrations, the lower the maximum specific growth rate observed (Fig. 1b). The highest specific growth rate (0.04/h) was obtained at the highest carob pulp syrup dilution (dilution 1:10.5 v/v, corresponding to 8.8 g/l of glucose) suggesting that at lower carob pulp syrup dilutions, *C. cohnii* growth was inhibited. The highest DHA percentages of TFA were also observed at this carob pulp syrup dilution (1:10.5 v/v, Table 2). As *C. cohnii* CCMP 316 growth was inhibited at glucose concentrations higher than 30 g/l (unpublished data), it was suggested that the carob pulp syrup components other than glucose could also contribute to the microalgal growth inhibition at low syrup dilutions. In fact, organic acids and tannins, which are present in high concentrations in the carob pulp have been reported as potential microbial growth inhibitors (Albergaria et al. 1999).

Selection of the best nitrogen source

The effect of different nitrogen sources (yeast extract and ammonium chloride) on *C. cohnii* growth and fatty acid composition was then studied in nephelometer flasks containing diluted carob pulp syrup supplemented with sea salt (Tables 1, 2). The highest specific growth rate (0.04/h) was obtained once again at the highest carob syrup dilution (1:10.5 v/v), when yeast extract was used as nitrogen source (Table 1).

When 5 g of yeast extract/l were added to the diluted carob syrup (1:10.5 v/v), the DHA percentage

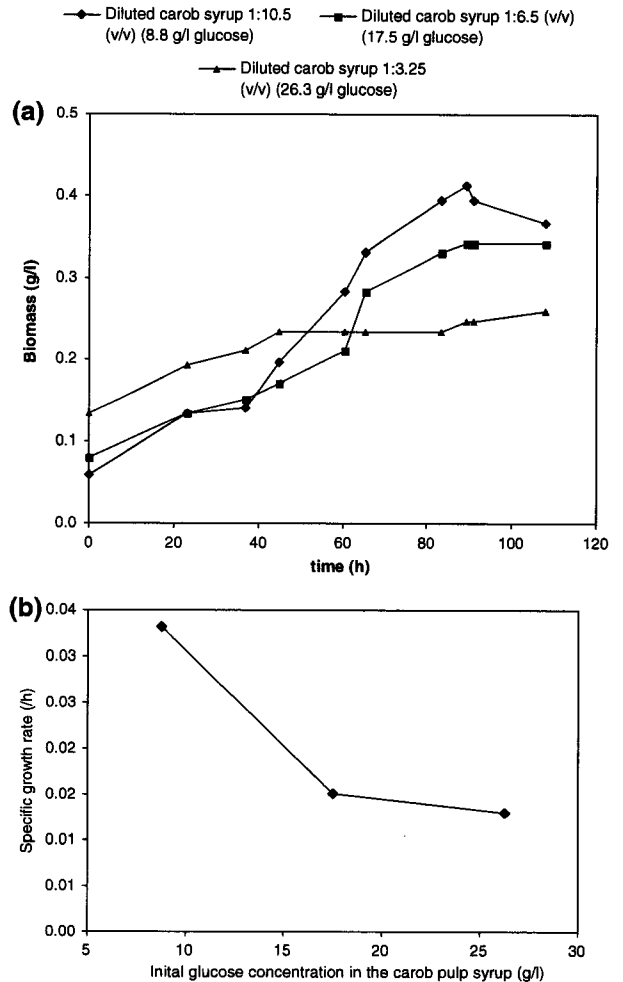


Fig. 1 Effect of the carob pulp syrup dilution on *C. cohnii* CCMP 316 growth in nephelometer flask. (a) Time course of the biomass concentration at different carob pulp syrup dilutions (the corresponding glucose concentration is in brackets). Plotted data represent the average of two independent replicates. Biomass standard deviations did not exceed 10%. (b) Effect of the carob pulp syrup dilution (expressed as glucose concentration) on the maximum specific growth rate

of TFA was 63.1% (Table 2), and the DHA production volumetric rate (r_{DHA}) attained 1.33 mg/lh, which were higher than the DHA production resulting from the

Table 1 Effect of the nitrogen source on the *C. cohnii* CCMP 316 maximum specific growth determined in nephelometer flasks containing carob pulp at different dilutions. Data represent the average of two independent replicates

| μ_{max} (h) Carob pulp syrup dilutions | Nitrogen sources | |
|--|------------------|-------------------|
| | Yeast extract | Ammonium chloride |
| 1:10.5 (v/v) (8.8 g glucose/l) | 0.04 | 0.03 |
| 1:5.3 (v/v) (17.5 g glucose/l) | 0.02 | 0.02 |
| 1:3.5 (v/v) (26.3 g glucose/l) | 0.02 | 0.01 |

Table 2 *C. cohnii* CCMP 316 fatty acid composition at different carob pulp syrup dilutions supplemented sea salt and different nitrogen sources (yeast extract and ammonium chloride)

| Syrup dilution (w/w) | Medium formulation | % of TFA (mean \pm STD) | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|----------------|
| | | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 22:5 ω 3 | 22:6 ω 3 | Σ SFAs | Σ MUFAs | Σ PUFAs |
| 1:10.5 (8.8 g/l glucose) | CPS | 1.1 \pm 0.4 | 9.4 \pm 2.6 | 20.5 \pm 2.0 | 7.1 \pm 0.2 | 12.2 \pm 0.8 | 1.7 \pm 0.2 | 48.0 \pm 4.2 | 38.1 | 12.2 | 49.7 |
| | CPS + YE | 1.2 \pm 0.2 | 8.3 \pm 0.8 | 16.4 \pm 0.6 | 2.6 \pm 0.2 | 8.0 \pm 0.3 | 0.5 \pm 0.1 | 63.1 \pm 1.8 | 28.5 | 8.0 | 63.6 |
| | CPS + AC | 1.5 \pm 0.2 | 11.6 \pm 1.2 | 19.6 \pm 0.8 | 3.3 \pm 1.5 | 10.1 \pm 1.0 | 1.0 \pm 0.8 | 52.9 \pm 2.6 | 36.0 | 10.1 | 53.9 |
| 1:6.5 (17.5 g/l glucose) | CPS | 1.7 \pm 1.2 | 11.1 \pm 0.9 | 24.8 \pm 1.4 | 9.8 \pm 2.1 | 13.5 \pm 1.8 | 1.9 \pm 1.4 | 37.3 \pm 7.2 | 47.3 | 13.5 | 39.2 |
| | CPS + YE | 9.0 \pm 1.2 | 18.8 \pm 2.5 | 20.3 \pm 0.2 | 5.0 \pm 1.8 | 9.3 \pm 1.3 | 0.7 \pm 0.6 | 36.8 \pm 0.7 | 53.1 | 9.3 | 37.6 |
| | CPS + AC | 3.1 \pm 0.9 | 10.7 \pm 1.4 | 19.7 \pm 0.7 | 7.0 \pm 0.0 | 11.7 \pm 0.2 | 1.4 \pm 0.1 | 46.3 \pm 2.7 | 40.6 | 11.7 | 47.7 |
| 1:3.25 (26.3 g/l glucose) | CPS | 3.6 \pm 0.3 | 11.5 \pm 0.9 | 19.4 \pm 1.0 | 6.5 \pm 0.1 | 11.1 \pm 0.3 | 2.4 \pm 0.2 | 45.4 \pm 1.1 | 41.1 | 11.1 | 47.8 |
| | CPS + YE | 2.6 \pm 0.7 | 10.8 \pm 1.3 | 21.2 \pm 0.7 | 6.9 \pm 0.8 | 12.3 \pm 0.3 | 1.7 \pm 0.2 | 44.5 \pm 1.7 | 41.5 | 12.3 | 46.2 |
| | CPS + AC | 3.0 \pm 0.3 | 10.9 \pm 0.4 | 23.1 \pm 0.3 | 9.6 \pm 0.1 | 14.3 \pm 0.1 | 1.9 \pm 0.1 | 37.2 \pm 0.5 | 46.5 | 14.3 | 39.1 |

The carob syrup dilution is also expressed as glucose concentration. Data are expressed as mean \pm STD of, at least, four injections (two independent replicates injected twice)

Σ SFAs: Sum of saturated fatty acids (total); Σ MUFAs: Sum of monounsaturated fatty acids (total); Σ PUFAs: Sum of polyunsaturated fatty acids (total)

Legend: CPS: Carob pulp syrup; YE: yeast extract; AC: ammonium chloride

0.05 g/l of ammonium chloride addition (DHA percentage of TFA = 52.9% and $r_{\text{DHA}} = 0.59$ mg/lh). Therefore, yeast extract was selected for further bioreactor experiments. For the other syrup carob pulp dilutions, there was no additional benefit on *C. cohnii* DHA production resulting from the nitrogen source additions.

Bioreactor experiments

It has been reported that *C. cohnii* shows growth inhibition at glucose concentrations higher than 20 g/l (Jiang and Chen 2000b). For this reason, fed-batch cultivation should be preferred over batch cultivation for *C. cohnii* DHA production enhancement. In fed-batch cultures additional substrate is supplied to the fermenter at a rate such that the concentration of the substrate remains below the level at which it would begin to inhibit the growth (Sijtsma et al. 2005). A *C. cohnii* fed-batch cultivation using the optimal carob pulp syrup dilution (1:10.5 v/v, corresponding to a glucose concentration of 8.8 g/l) supplemented with sea salt and yeast extract was carried out (Fig. 2). Growth was exponential with an estimated specific growth rate of 0.05/h. The biomass concentration attained 42.0 g/l after 100.4 h, corresponding to a biomass volumetric production rate of 418 mg/lh (Table 3).

Regarding *C. cohnii* fatty acid composition (Table 4) the major fatty acid was DHA, comprising ~48% of TFA. The DHA percentage of biomass, DHA concentration and DHA productivity attained 4.4% 1.9 g/l and 18.5 mg/lh respectively, after 100.4 h. The amount

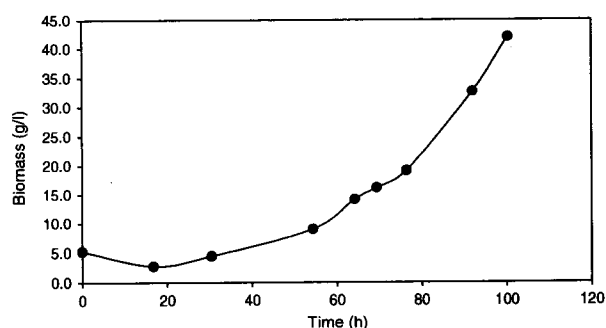


Fig. 2 *C. cohnii* CCMP 316 fed-batch fermentation in a 2-l fermenter using carob syrup as carbon source (dilution 1:10.5 v/v) supplemented with yeast extract 2 g/l. Plotted data represent the average of two independent replicates. Biomass standard deviations did not exceed 10%

of lipid has been calculated from the total amount of fatty acids and the internal standard (De Swaaf et al. 1999). In this work, the TFA percentage of biomass, TFA concentration and TFA productivity were 9.2%, 3.9 g/l and 38.8 mg/lh respectively, at the end of the fed-batch fermentation. Overall these results were higher than those reported by De Swaaf et al. (2003a) wherein a *C. cohnii* fed-batch fermentation lasting 120 h was fed by a medium containing glucose as main carbon source (50% w/v) (Table 3).

As DHA is a high-value product, the price of raw materials should not be a major concern. Acetic acid (340 €/tonne) and ethanol (300 €/tonne) have been used as carbon sources in *C. cohnii* fed-batch cultivations, yielding lower biomass productivities although higher DHA productivities, comparing to glucose

Table 3 Comparison of carob pulp syrup with other carbon sources used for *C. cohnii* DHA production

| Feed | Strain | Time (h) | [Biomass] (g/l) | r_x (mg/lh) | % DHA of TFA | % DHA of biomass | [DHA] (g/l) | r_{DHA} (mg/lh) | %TFA of mass | [TFA] (g/l) | r_{TFA} (mg/lh) | References |
|---------------------------------------|------------|----------|-----------------|---------------|--------------|------------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|-------------------|-----------------------|
| Acetic acid | ATCC 30772 | 210 | 77 | 281 | - | - | 9.5 | 45 | - | - | - | De Swaff et al. 2003a |
| Ethanol | ATCC 30772 | 200 | 59 | 385 | - | - | 10.4 | 52 | - | - | - | De Swaff et al. 2003b |
| Glucose (50% (w/v)) | ATCC 30772 | 120 | 26 | 216 | - | - | 1.7 | 14 | - | - | - | De Swaff et al. 2003a |
| Diluted carob pulp syrup (1:10.5 v/v) | CCMP316 | 100.4 | 42 | 418 | 48.0 | 4.4 | 1.9 | 18.5 | 9.2 | 3.9 | 38.8 | This work |

Table 4 Fatty acid composition of *C. cohnii* CCMP 316 grown in a 2-l bioreactor containing diluted carob pulp syrup (1:10.5 v/v) supplemented with 2 g yeast extract/l and 25 g sea salt/l, after 100.4 h of growth

| Fatty acids | % of TFA |
|-----------------|------------|
| 12:0 | 1.7 ± 0.8 |
| 14:0 | 8.2 ± 2.2 |
| 16:0 | 21.8 ± 2.4 |
| 18:0 | 7.6 ± 0.8 |
| 18:1 | 10.5 ± 0.3 |
| 22:5 ω 3 | 2.1 ± 0.6 |
| 22:6 ω 3 | 48.0 ± 5.1 |
| Σ SFs | 39.4 |
| Σ MUFAs | 10.5 |
| Σ PUFAs | 50.1 |

(De Swaaf et al. 2003a; De Swaaf et al. 2003b; Sijtsma et al. 2005) (Table 3). However, the handling problems of these carbon sources as feedstock in large-scale fermentations mentioned above, makes carob pulp syrup, a cheap carob industry by-product (105 €/tonne), an attractive feedstock to be used in DHA large scale production from *C. cohnii* due its easy, clean and safe handling. In addition, although carob pulp syrup results from a previous extraction step, such a process is inexpensive and results in minimal waste as the resulting waste can be utilized in the production of other products (Petit and Pinilla 1995). Moreover, the use of carob pulp as feedstock of high value fermentation products may be a useful way of disposing of this carob industry by-product, thus reducing industrial residues, contributing for the environmental protection.

Conclusions

In this work, the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* was able to grow on low-cost medium formulations containing diluted carob syrup, yielding higher biomass and DHA productivities than the reported media containing glucose. The easy and inexpensive carob syrup extraction process and the environmental benefits resulting from the easy and clean handling of the syrup make this carob industry by-product a promising feedstock for DHA large-scale production from *C. cohnii*.

Acknowledgment The authors thank Dr. Francisco Giro (UFMB/DB/INETI) for the gift of carob pulp.

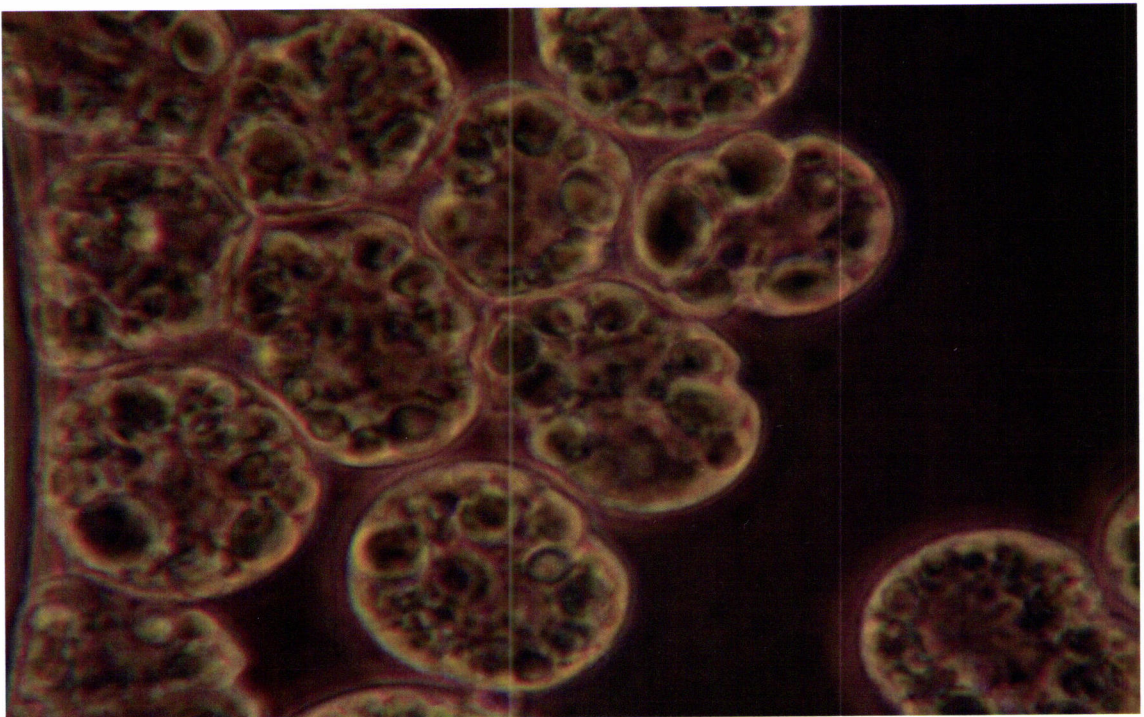
References

- Albergaria H, Roseiro J, Collaço MT (1999) Technological aspects and kinetic analysis of microbial gum production in carob. *Agro Food Industry Hi-Tech* 10:24–26

- Borowitzka MA (1992) Algal biotechnology products and processes: matching science and economics. *J Appl Phycol* 4:267–279
- De Swaaf ME, Rijk TC, Eggink G et al. (1999) Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *J Biotechnol* 70:185–192
- De Swaaf ME, Sijtsma L, Pronk JT (2003a) High-cell density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*. *Biotechnol Bioeng* 81:666–672
- De Swaaf M, Pronk JT, Sijtsma L (2003b) Fed-batch cultivation of docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:40–43
- De Swaaf ME, Sijtsma L (2004) Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:146–153
- Guillard RL (1960) A mutant of *Chlamydomonas moewusii* lacking contractile vacuoles. *J Protozool* 7:262–269
- Guillard RL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (eds) *Culture of marine invertebrate animals*, Plenum Press, New York, p 26
- Guillard RL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can J Microbiol* 8:229–239
- Jiang Y, Chen F, Liang S-Z (1999) Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochem* 34:633–637
- Jiang Y, Chen F (2000a) Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. *J Am Oil Chem Soc* 77:613–617
- Jiang Y, Chen F (2000b) Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Proc Biochem* 35:1205–1209
- Lepage G, Roy CC (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27:114–119
- Molina E, Fernández J, Ación FG et al. (2001) Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J Biotechnol* 92:113–131
- Petit MD, Pinilla JH (1995) Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *Lebensm-Wiss u-Technol* 28:145–152
- Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86:807–815
- Roseiro JC, Gírio FM, Collaço MT (1991) Yield improvements in Carob sugar extraction. *Process Biochem* 26:179–182
- Sijtsma L, Anderson A, Ratledge C (2005) Alternative carbon sources for heterotrophic production of docosahexaenoic acid by the marine alga *Cryptocodinium cohnii*. In: Cohen Z, Ratledge C (eds) *Single cell oils*, AOCs PRESS, Champaign, p 107
- Tuttle RC, Loeblich AR (1975) An optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phycologia* 14:1–8

CHAPTER 4

Effect of *n*-dodecane on *Cryptocodinium cohnii* fermentations and DHA production



Cryptocodinium cohnii (Seligo) CCMP 316. Ampliação (× 1000)

Teresa Lopes da Silva · Ana Mendes
Rui L. Mendes · Vítor Calado · Sebastião S. Alves
Jorge M. T. Vasconcelos · Alberto Reis

Effect of *n*-dodecane on *Cryptocodinium cohnii* fermentations and DHA production

Received: 5 October 2005 / Accepted: 5 January 2006 / Published online: 24 February 2006
© Society for Industrial Microbiology 2006

Abstract The potential use of *n*-dodecane as an oxygen vector for enhancement of *Cryptocodinium cohnii* growth and docosahexaenoic acid (DHA) production was studied. The volumetric fraction of oxygen vector influenced the gas–liquid volumetric mass transfer coefficient k_{LA} positively. The k_{LA} increased almost linearly with the increase of volumetric fraction of *n*-dodecane up to 1%. The stirring rate showed a higher influence on the k_{LA} than the aeration rate. The effects of this hydrocarbon on *C. cohnii* growth and DHA production were then investigated. A control batch fermentation without *n*-dodecane addition (CF) and a batch fermentation where *n*-dodecane 1% (v/v) was added (DF) were carried out simultaneously under the same experimental conditions. It was found that, before 86.7 h of fermentation, the biomass concentration, the specific growth rate, the DHA, and total fatty acids (TFA) production were higher in the CF. After this fermentation time, the biomass concentration, the DHA and TFA production were higher in the DF. The highest DHA content of biomass (6.14%), DHA percentage of TFA (51%), and DHA production volumetric rate r_{DHA} ($9.75 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) were obtained at the end of the fermentation with *n*-dodecane (135.2 h). The dissolved oxygen tension (DOT) was always higher in the DF,

indicating a better oxygen transfer due to the oxygen vector presence. However, since the other *C. cohnii* unsaturated fatty acids percentages did not increase with the oxygen availability increase due to the *n*-dodecane presence, a desaturase oxygen-dependent mechanism involved in the *C. cohnii* DHA biosynthesis was not considered to explain the DHA production increase. A selective extraction through the *n*-dodecane was suggested.

Keywords *Cryptocodinium cohnii* · *n*-Dodecane · k_{LA} · DHA production and CSTR

Abbreviations CF: Control batch fermentation without *n*-dodecane · CSTR: Continuous stirred tank reactor · DF: Batch fermentation with *n*-dodecane 1% (v/v) · DHA: Docosahexaenoic acid (22:6 ω 3) · DOT: Dissolved oxygen tension · DPM: Dynamic pressure method · k_{LA} : Gas–liquid volumetric mass transfer coefficient (h^{-1}) · PUFA: Polyunsaturated fatty acids · TAG: Triacylglycerols · TFA: Total fatty acids · r_{DHA} : DHA production volumetric rate ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) · rpm: Rotations per minute · r_{TFA} : TFA production volumetric rate ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) · vvm: Volume of gas per volume of aerated liquid per minute

T. L. da Silva · A. Mendes · V. Calado · A. Reis (✉)
Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação,
Departamento de Biotecnologia, Unidade de Bioengenharia e
Bioprocessos, Estrada do Paço do Lumiar, 22,
1649-038, Lisboa, Portugal
E-mail: alberto.reis@ineti.pt
Tel.: + 351-21-0924726
Fax: + 351-21-7163636

R. L. Mendes
Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação,
Departamento de Energias Renováveis, Unidade de Biomassa,
Estrada do Paço do Lumiar, 22, 1649-038, Lisboa, Portugal

S. S. Alves · J. M. T. Vasconcelos
Instituto Superior Técnico, Departamento de Engenharia
Química e Biológica, Centro de Engenharia Biológica e Química,
1049-001 Lisboa, Portugal

Introduction

Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω 3) is regarded to be essential for the proper visual and neurological development of infants [1–3]. Despite being an important polyunsaturated fatty acid (PUFA) in human breast milk, in the past, DHA was generally absent from infant formulas [4]. However, the World Health Organization (WHO), the British Nutritional Foundation (BNF), the European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN), and the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL) have recognized the importance of DHA and arachidonic

acid (AA) and recommended that long-chain PUFA should be included in all infant formulas [5]. Presently, over 50% of all infant formulas in the United States contain a blend of DHA and AA [6].

The traditional source of omega-3 fatty acids is fish oil. However, the use of fish oil as a food additive is limited due to problems associated with its typical fishy smell, unpleasant taste, and poor oxidative stability. Furthermore, the presence of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 ω 3) in fish oil is undesirable for application in infant food as this fatty acid is associated with neonate growth retardation [7, 8]. Moreover, fish oil ω 3 PUFA content fluctuates widely as the fish stocks are declining. Therefore, alternative sources are of interest. Microalgae biomass is particularly suitable for the extraction and purification of individual PUFA due to its stable and reliable composition. In addition, PUFA from cultured microalgae are cholesterol free, contaminant free [e.g. heavy metals, polychlorobiphenyls (PCBs)], and taste good [9]. Attempts have been made to produce DHA phototrophically by growing microalgae in photobioreactors, but it is difficult to achieve high biomass concentration and high DHA productivities. This is due to unsolved problems, namely light limitation and oxygen accumulation, in photoautotrophic cultures [10]. Screening of microalgae for heterotrophic production potential of DHA is therefore of potential significance. The heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* is an interesting source for DHA production [11–13], and for research on DHA biosynthesis [14–18], due to its unique fatty acid composition. *C. cohnii* can accumulate a high percentage of DHA [25–60% of the total fatty acids (TFA)] in its triacylglycerols (TAG) with only trivial amounts of other PUFA [19]. This characteristic makes the DHA purification process from this microorganism very attractive particularly for pharmaceutical applications, since the inclusion of PUFA as a drug component requires its purification to over 95% [20].

Important parameters for optimal DHA production include growth rate, final biomass concentration, total lipid content, and DHA proportion of the lipid. Significant lipid (TAG) accumulation does not occur during active growth in a nutrient-replete medium; it occurs during idiophase, after a culture nutrient other than the carbon source is depleted. The limiting nutrient is usually nitrogen. Therefore, industrial *C. cohnii* fermentations are usually a carbon-fed batch and progress in two stages. The first is the active growth phase during which the lipid content of the biomass is about 20%. Once the nitrogen source is depleted, carbon is continuously supplied to the fermenter. Since cell growth and division is halted due to the lack of nitrogen for de novo protein and nucleotide synthesis, the supplied carbon is converted into a storage lipid (TAG) rich in DHA [6].

The aeration conditions are of crucial importance for *C. cohnii* cells growth as the specific growth rate decreased when the cells are growing under restricted supply oxygen conditions [21]. Moreover, oxygen transfer is likely to be a limiting factor during a com-

mercial-scale high-cell-density cultivation of *C. cohnii*, leading to the process productivity decrease. In such conditions, to maintain aerobic conditions, a very high stirrer speed had to be maintained during a large part of the process, resulting in the power input increase [22]. On the other hand, cell proliferation of dinoflagellates is negatively affected by mechanical agitation [19, 23], the way generally used to improve mass transfer in submerged fermentations.

It is possible to increase the oxygen transfer in microbial fermentations by adding an organic phase with a higher affinity for oxygen (oxygen vector) [24]. Whereas no more than the saturation concentration of oxygen can be dissolved in the aqueous phase, the supply of oxygen to the aqueous phase from the gas stream may be supplemented by equilibrium partitioning of dissolved oxygen from the organic phase to the aqueous phase. Several research groups have applied oxygen vectors to enhance oxygen supply and, as a consequence, to increase the biomass in different culture systems [10, 25, 26]. The main oxygen vectors used in biotechnology are hydrocarbons such as *n*-dodecane and *n*-hexadecane [27–32], perfluorocarbons [26, 33, 34] as well as vegetable oils [35]. In addition, biocompatible organic solvents have been used in milking microalgae products such as β -carotene from *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. In this process, the continuous simultaneous production and selective extraction of product from cells led to higher productivity [36].

The present work studied the impact of a hydrocarbon (*n*-dodecane) addition on *C. cohnii* cultures and DHA production. The effect of different hydrocarbon concentrations on the gas-liquid volumetric transfer coefficient k_{La} was previously assessed in the system.

Materials and methods

k_{La} measurements

A 2-l continuous stirred tank reactor glass vessel with 1.5-l working volume (SGI, France), fitted with two equally spaced baffles and equipped with one four-blade Rushton turbine, with a diameter equal to 48 mm was used. The stirrer was placed on the shaft at a distance of 5.2 mm from the vessel bottom. The sparging system consisted of a five-hole (0.5 mm diameter) single ring sparger with 6 cm diameter, placed 2.2 mm from the vessel bottom.

k_{La} was measured at two aeration rates (0.5 and 1 vvm) and two stirring rates (250 and 500 rpm). The dissolved oxygen concentration was measured using a polarographic probe (Mettler Toledo, Columbus, USA). It was assumed that the response of the oxygen electrode to a change in the dissolved oxygen concentration was sufficiently fast in the analyzer, since in all the runs in this work the k_{La} was less than 0.1 s⁻¹ [37].

The data acquisition was performed using the DATA TAKER DT 500 Series 3 software (Rowville, Australia).

The gas-liquid transfer coefficient was measured by the dynamic pressure method (DPM) described by Linek et al. [38]. The principle of the method lies in the quick change of the total pressure in the vessel and the consequent recording of the oxygen probes response in liquid phase in each stage [39]. All the experiments were carried out at 27 °C.

Oxygen vector

n-Dodecane (p.a., Merck, Darmstadt, Germany; density 750 g l⁻¹ at 20°C; oxygen solubility 54.9×10⁻³ g l⁻¹ at 35°C and atmospheric air pressure [40]) was added to tap water in fractions of 0.5, 1, and 10% (v/v).

Cryptocodinium cohnii fermentations

Growth conditions

Cryptocodinium cohnii CCMP 316 was obtained from the Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) Culture Collection (Maine, USA) and was maintained in axenic conditions by sub-culturing every 2 weeks in f/2 + NPM medium [41-43] supplemented with glucose (6 g l⁻¹). Cultures were grown on 500 ml of the f2 + NPM medium supplemented with glucose (15 g l⁻¹) in 2-l shake flasks at 120 rpm and 27 °C in the dark. After 3 days (exponential growth phase) these cultures were used to inoculate the bioreactors with 10% (v/v) inoculum.

Bioreactor experiments

The growth medium contained 2 g l⁻¹ yeast extract, 25 g l⁻¹ NaCl, and 0.05% (w/v) silicone as antifoaming. The glucose (20 g l⁻¹) was sterilized separately and mixed with the other components after cooling to make up the fermentation medium. The pH value was then adjusted to 6.5 by adding a concentrate sodium hydroxide or acid solution of 1 M NaOH or 1 M HCl. The pH of the fermentation medium was measured with a Mettler Toledo steam-sterilizable pH electrode (Columbus, USA) and was controlled with a pH controller (SGI, Mountain View, USA). The dissolved oxygen tension (DOT) in the medium was measured with a Mettler Toledo oxygen electrode (Columbus, USA) and recorded in a recorder (SGI, Mountain View, USA). The stirring rate (100-600 rpm) was manually increased whenever the DOT was below 40%. Nutrient pulses (glucose and/or yeast extract) were added whenever the residual glucose concentration in the broth decreased below 10 g l⁻¹ or the dissolved oxygen increased above 80%, except at the end of the fermentation. In this way, the exponential phase could be followed by a nutritional limitation other than glucose, in order to enhance lipid production [19].

The aeration rate was 1 vvm (75 l h⁻¹).

A control fermentation (CF) and a fermentation wherein an oxygen vector (*n*-dodecane, 1% v/v) was added (DF) were carried out under the same experimental conditions at the same time.

Organic phase

n-Dodecane (Merck, p.a.) was added to *C. cohnii* fermentations at a concentration of 1% (v/v).

Dry cell weight measurements

Biomass, expressed as dry cell mass, was measured gravimetrically on 5 ml culture samples, from which cells were harvested and dried for 24 h at 100°C. Biomass data resulted from the average of a minimum of two representative samples.

Glucose measurements

The residual glucose concentration in samples from the culture medium was analyzed by the 3,5-dinitrosalicylic acid method [44]. Glucose data resulted from an average of at least three representative samples.

Fatty acid analysis

Fatty acids' extraction and preparation of methyl esters were carried out according to Lepage and Roy [45] with modifications. Freeze-dried samples of *C. cohnii* (100 mg) were transmethylated with 2 ml of methanol:acetyl chloride (95:5 v/v) and 0.2 ml heptadecanoic acid (5 mg ml⁻¹, Nu-Check-Prep, Elysian, USA) as internal standard. The mixture was sealed in a light-protected Teflon-lined vial under nitrogen atmosphere and heated at 80°C for 1 h. The vial contents were then cooled, diluted with 1 ml water, and extracted with 2 ml of *n*-hexane. The hexane layer was dried over Na₂SO₄, evaporated to dryness under nitrogen atmosphere, and redissolved in hexane, which contained the methyl esters. The methyl esters were then analyzed by gas-liquid chromatography on a Varian 3800 gas-liquid chromatograph (Palo Alto, USA), equipped with a flame ionization detector. Separation was carried out on a 0.32 mm×30 m fused silica capillary column (film 0.32 μm) Supelcowax 10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with helium as carrier gas at a flow rate of 3.5 ml min⁻¹. The column temperature was programmed at an initial temperature of 200°C for 8 min, then increased at 4°C min⁻¹ to 240°C and held there for 8 min. Injector and detector temperatures were 250 and 280°C, respectively, and split ratio was 1:50. Peak identification was carried out using known standards (Nu-Chek-Prep, Elysian, USA). Duplicates of each sample were carried

out and each duplicate was injected twice so that the final result was obtained from an average of four values.

Results and discussion

k_{La} measurements

The influence of different oxygen-vector (*n*-dodecane) volumetric fractions in tap water on the gas-liquid volumetric mass transfer coefficient k_{La} was investigated and the results are depicted in Fig. 1. The volumetric fraction of oxygen-vector ϕ had a significant influence on k_{La} . For small volumetric fractions (0.5 and 1%), k_{La} increased almost linearly with the increase of ϕ . Above 1% (v/v), this linearity was broken. Similar results were obtained by Jia et al. [29], Jialoong et al. [30], and Rols et al. [40]. Accordingly to Rols et al. [40], this broken slope region may be due to an increase in the apparent viscosity, which might affect the oxygen transfer rate.

The k_{La} was also determined at two aeration rates (0.5 and 1 vvm) and two stirring rates (250 and 500 rpm). At $\phi = 10\%$, the aeration rate increase (from 0.5 to 1 vvm) brought about an increase in k_{La} of about 30%, whilst the stirring rate increase (250–500 rpm) led to an increase in k_{La} of about 40%. The same tendency was observed for the other *n*-dodecane volumetric fractions. It was clear that in general, the k_{La} enhancement due to the stirring rate increase was more pronounced than due to the aeration rate increase. These results are in accordance to Doran [46] who stated that the stirring rate increase has a higher influence on the k_{La} than the aeration rate.

The advantage of using an oxygen vector in microbial cultures is that it increases the oxygen transfer rate from the gas phase to the micro-organisms without the need for extra energy supply and the consequent shear stress

increase which may affect sensitive organisms such as microalgae [23]. Oxygen vectors can act as surface-active agents to lower the surface tension of water and increase the gaseous specific interfacial area [4].

Cryptocodinium cohnii fermentations

Previous work (not published) demonstrated that the addition of *n*-dodecane as an oxygen vector up to volumetric fractions of 1% to the microalga *C. cohnii* shake flask cultures increased the biomass yield. However, at *n*-dodecane volumetric fractions higher than 1%, *C. cohnii* cell lysis was observed. For that reason, this hydrocarbon was added to *C. cohnii* fermentations at the volumetric fraction of 1%.

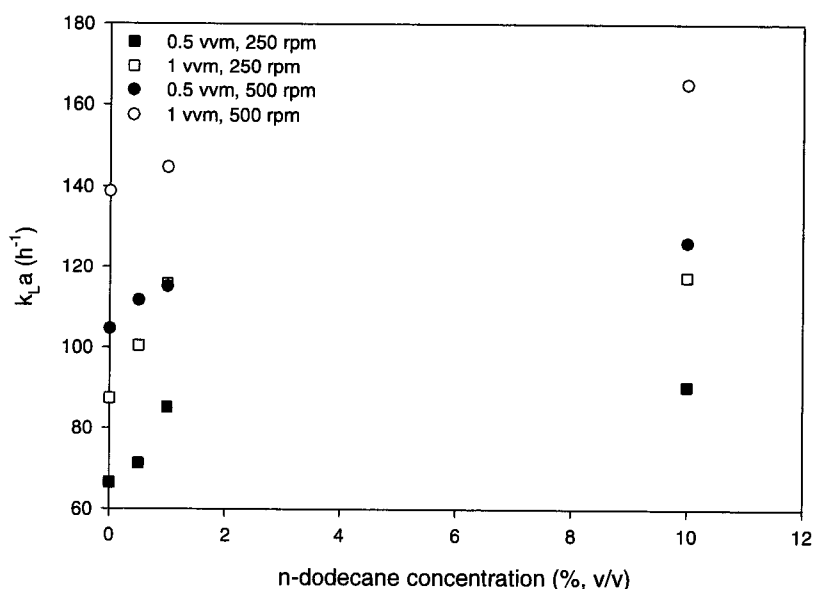
The effect of the *n*-dodecane presence on *C. cohnii* batch cultures is shown in Fig. 2. The stirring rate changes during the fermentation time course are depicted in Fig. 2a.

The biomass concentration measured in CF seemed to be higher than that in the DF, until 86 h. The specific growth rate, calculated in this time period (24–86 h), was 0.020 h^{-1} for the CF and 0.016 h^{-1} for the DF.

At 68.5 h, a pulse of nutrients (glucose and yeast extract) was added as the DOT attained 100 and 80% for the DF and CF, respectively, indicating that a nutrient other than glucose was limiting the cell growth. At 86.7 h, the CF biomass concentration attained 14.5 g l^{-1} , whilst the biomass concentration of the DF attained 12 g l^{-1} .

At this fermentation time, a new yeast extract pulse was added as the DOT readings increased again (100 and 91.1% for CF and DF, respectively). After 86.7 h, the measured biomass concentration in DF steadily increased until the end of the fermentation (21.45 g l^{-1} at $t = 135.2 \text{ h}$), whilst the CF biomass attained lower

Fig. 1 Effect of *n*-dodecane volumetric fractions on the gas-liquid volumetric transfer coefficient k_{La} for different stirring rates and aeration rates



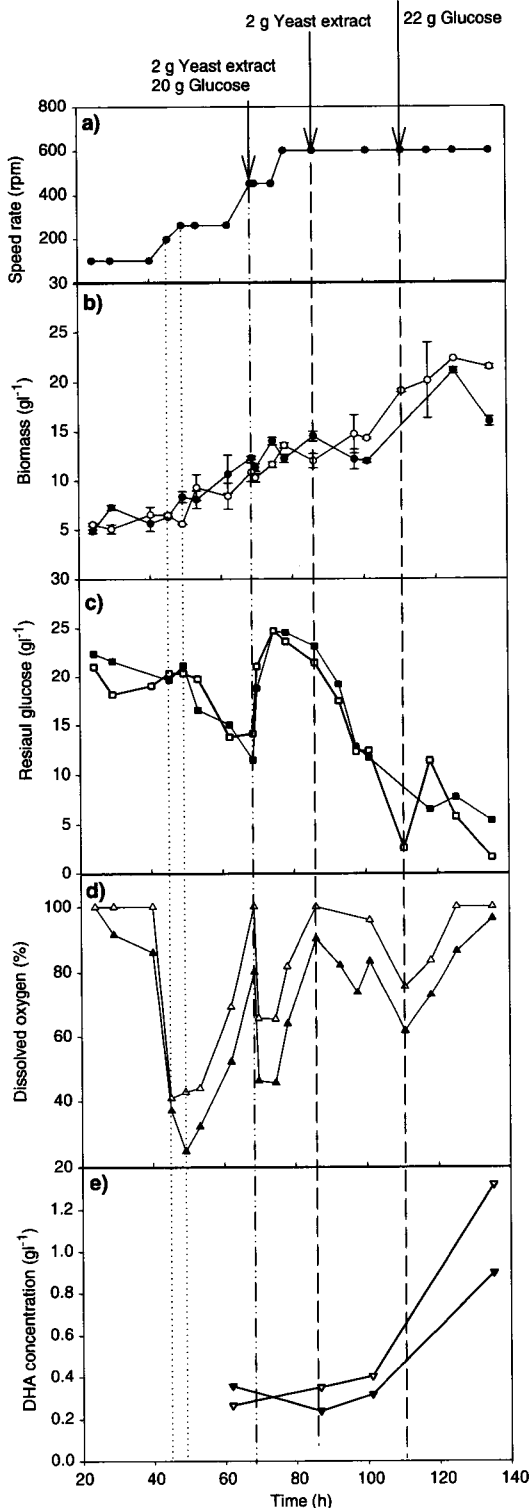


Fig. 2 Effect of *n*-dodecane addition on *C. cohnii* batch profile fermentation. Filled symbols control fermentation, open symbols fermentation with *n*-dodecane 1% (v/v), dotted lines speed rate increase, dash lines nutrient addition, dash-dotted lines speed rate increase and nutrient addition. (a) speed rate, (b) biomass, (c) dissolved oxygen, (d) DHA concentration

biomass concentration (15.95 g l^{-1} at $t=135.2 \text{ h}$). It seemed that, after an adaptation period to the *n*-dodecane presence (86.7 h), wherein the cell growth was affected, the microalga recovered and attained higher dry cell weight values. This is supported in Fig. 2c, where it is shown that after 77.8 h, *C. cohnii* glucose uptake in the presence of *n*-dodecane was higher than the glucose uptake in the absence of *n*-dodecane, in most of the time points measured.

At 110.7 h, after an active cell growth phase, a new pulse of glucose was added, in order to achieve the nutrient requirements for lipids accumulation. It is known that after the exponential phase, when a nutrient is depleted (preferably the nitrogen), the carbon source must be supplied to the cells, so that the supplied carbon is converted into storage lipids which are rich in DHA in *C. cohnii* cells [6].

Significant differences were found between the DOT profiles of both fermentations (Fig. 2d). The DOT readings in the presence of *n*-dodecane were always higher than those observed in the absence of the organic solvent (1.7 times higher at $t=49 \text{ h}$) due to the presence of the oxygen vector. Even when the biomass concentration measured in DF was higher than that in CF ($t>86.7 \text{ h}$), the DOT in the former fermentation remained higher indicating an enhanced mass transfer through the oxygen-vector addition. A similar behavior was reported by Rols et al. [40] who used *n*-dodecane as an oxygen vector at different volumetric fractions to study the effect of this hydrocarbon on *Aerobacter aerogenes* cultures.

The effect of the *n*-dodecane presence on *C. cohnii* DHA production is shown in Fig. 2e. At 62 h, cells growing in the absence of *n*-dodecane produced more DHA (0.36 g l^{-1}) than cells growing in the presence of the hydrocarbon (0.27 g l^{-1}). However, this tendency was inverted at 86.7 h, when the DHA produced by *C. cohnii* cells growing in the presence of the *n*-dodecane increased until the end of the fermentation, attaining 1.32 g l^{-1} at 135.2 h. During the same time period, the DHA produced by the cells growing in the *n*-dodecane absence reached a minimum at 86.7 h, and afterwards increased until the end of the fermentation, attaining 0.90 g l^{-1} at 135.2 h.

The DHA content of the biomass, the DHA percentage of TFA, and the DHA production volumetric rate (r_{DHA}) followed a similar pattern (Fig. 3a-c). After a minimum at 86.7–101 h, *C. cohnii* cells increased their DHA content, concentration, and productivity until the end of the fermentation (135.2 h). The DHA content in biomass, concentration, and productivity minimum observed at 86.7 and 101 h might be due to the high yeast extract concentration in the broth, resulting from the previous addition. As already mentioned, the DHA production is enhanced when the nutrient limitation occurs, especially nitrogen. As the yeast extract is the nitrogen source, its presence in the broth might have

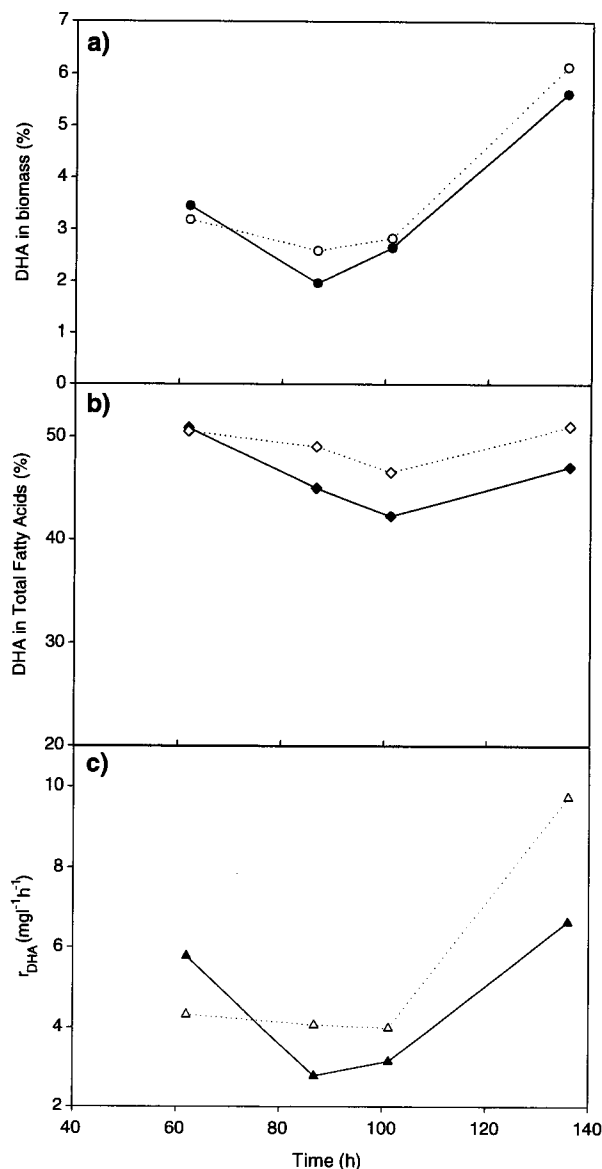


Fig. 3 Effect of *n*-dodecane addition on *C. cohnii* DHA content of biomass (a), DHA percentage of total fatty acids (b) and DHA productivity (c). Filled symbols control fermentation, open symbols fermentation with *n*-dodecane 1% (v)

decreased the DHA production/productivity. In fact, it has been reported that the lipid content of *C. cohnii* cells decreased markedly at high yeast extract concentrations [47].

From 86.7 h until the end of the fermentation, the DHA content in biomass, DHA percentage of TFA, and r_{DHA} of the DF was higher than those measured in the CF. The DHA content of biomass produced in the *n*-dodecane presence attained $6.14\ g\ l^{-1}$ at 135.2 h, 9% more than the DHA produced in the absence of the organic solvent. The DHA percentage in the TFA in the presence of the *n*-dodecane was 51%, 9% more than the DHA percentage in the TFA found in *C. cohnii* cells

grown in the *n*-dodecane absence. The r_{DHA} , a crucial parameter in DHA production by microbial fermentation [48], attained $9.75\ mg\ l^{-1}\ h^{-1}$ in the DF, 47% more than the r_{DHA} obtained in the CF.

De Swaaf et al. [47] calculated the amount of lipid from the total amount of fatty acids and the internal standard. As observed for the DHA content, concentration, and productivity; the TFA percentage of biomass, the TFA production, and the TFA volumetric rate increased at the end of the fermentation (Fig. 4).

Although the TFA content of cells grown in the absence and in the presence of *n*-dodecane was almost the same ($\approx 12\%$ at 135.2 h, Fig. 4a), the DHA percentage of the TFA was higher in the later situation (Fig. 3b).

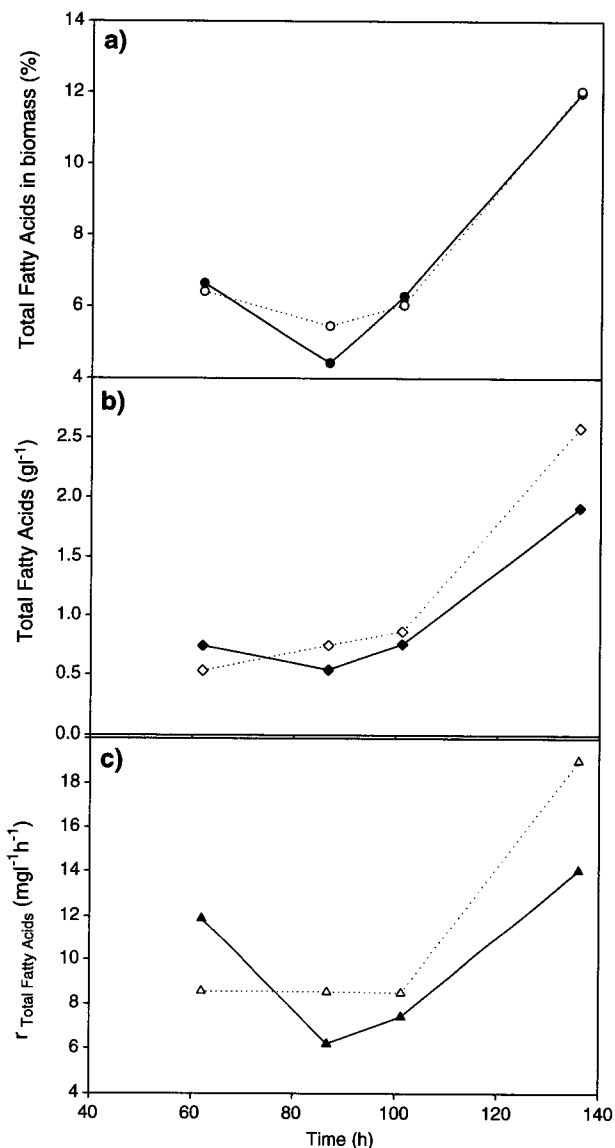


Fig. 4 Effect of *n*-dodecane addition on *C. cohnii* TFA content of biomass (a), TFA concentration (b) and TFA productivity (c). Filled symbols control fermentation, open symbols fermentation with *n*-dodecane 1% (v)

The TFA concentration generally increased with the time fermentation and was higher in the DF, reaching 2.58 g l^{-1} at the end of fermentation (35% more than the TFA concentration in the CF) (Fig. 4b). After 86.7 h, the r_{TFA} was also higher in the DF, attaining $19 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at the end of the fermentation, 35% more than the r_{TFA} obtained in the CF (Fig. 4c).

Table 1 shows *C. cohnii* fatty acid composition analyzed in cells taken at different fermentation times. The total unsaturated fatty acids was higher in the cells growing in the presence of *n*-dodecane, which was mainly due to the DHA increase, as the other fatty acids remained almost unchanged. Several factors might have contributed for this finding.

It has not been cleared whether desaturases are involved in the *C. cohnii* DHA production [18, 49]. It has been suggested that the final step leading to the DHA production is distinct from that in most of the microorganisms, where the saturated fatty acids are successively desaturated and elongated through a series of reactions, using the fatty acid synthetase (FAS) complex of enzymes, leading to the formation of various PUFAs [18, 50]. In fact, Sonnenborn and Kunay [51] reported in vitro the production of saturated fatty acids, mainly 14:0 and 16:0, by a purified cytosol enzyme complex of *C. cohnii*. They concluded that the FAS system should be operative in *C. cohnii* and might supply the precursors for the DHA biosynthesis. However, Beach et al. [14] incubating *C. cohnii* cells in the presence of ^{14}C -labeled fatty acids ranging from 10 to 18 carbon atoms found that label was detected in oleic acid (18:1, the most abundant monounsaturated fatty acid in *C. cohnii*) but not in DHA. De Swaaf et al. [49] reported that de novo synthesis of DHA with desaturases might occur, although it has not been cleared whether oxygen-dependent desaturases are active in the biosynthesis of DHA in *C. cohnii*. However, the system appeared to be aerobic as, in a study of Beach and Holz [21], the DHA and monounsaturated fatty acids sharply decreased when a growing culture of *C. cohnii* was switched from gassing with air to nitrogen gas. In the present work, it was demonstrated that the oxygen vector presence allowed a higher oxygen availability in *C. cohnii* fermentations, and in this case, the DHA productivity increased, but the other unsaturated fatty acids remained almost

unchanged. This fact suggests that probably another factor led to *C. cohnii* DHA production increase in the presence of the hydrocarbon.

Biocompatible organic solvents have been used in milking microalgae products such as β -carotene from *D. salina* in two-phase bioreactors, leading to higher productivity [36]. In the present work, the use of *n*-dodecane might have worked as a selective extraction solvent, removing TAG which, in *C. cohnii* cells, are known to be rich in DHA. It has been reported that storage lipids (TAG) are easier extracted than structural lipids when using nonpolar organic solvents [52]. As storage lipids (TAG) have protective effect on the cells, allowing their survival during starvation periods, its extraction will stimulate their substitution by newly synthesized lipids, thereby enhancing its production. In this way, the TFA produced by *C. cohnii* cells grown in the *n*-dodecane presence would be enriched in DHA. This mechanism could explain the higher DHA productivity observed in *C. cohnii* cells grown in the presence of *n*-dodecane although the TFA content in *C. cohnii* cells grown in the presence and in the absence of *n*-dodecane was nearly the same, as mentioned above.

Unfortunately, the low *n*-dodecane volumetric fraction used in this work did not allow the extracted fatty acid analysis in the organic phase, as no hydrocarbon was found in the broth at the end of the fermentation. Two factors might have contributed for this observation. First, the high stirring rate used after 77.8 h (600 rpm) might have broken the *n*-dodecane droplets into very small droplets so that an emulsion *n*-dodecane-aqueous broth could have formed, hindering the organic phase separation from the aqueous phase. Second, it has been reported that *n*-dodecane is absorbed by *D. salina* cells specially in the cell membrane [36]. The same mechanism could have occurred in our system.

Conclusions

In this work, it was possible to increase the DHA production by *C. cohnii* cells through the addition of *n*-dodecane, a cheap solvent which can be used simultaneously as an oxygen vector, enhancing the oxygen transfer, and as an organic phase, with the ability to

Table 1 Influence of *n*-dodecane presence on *C. cohnii* cellular fatty acid composition at different fermentation times

| Fermentation time (h) | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 16:1 ω 9 | 18:0 | 18:1 ω 9 | 22:5 ω 3 | 22:6 ω 3 | % Sat. | % Unsat. |
|-----------------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|----------|
| CF | | | | | | | | | | |
| 62.0 | 2.0 \pm 0.0 | 11.6 \pm 1.7 | 23.6 \pm 0.6 | 0.2 \pm 0.0 | 5.0 \pm 0.8 | 8.6 \pm 1.3 | 0.4 \pm 0.1 | 50.8 \pm 1.0 | 42.3 | 60.1 |
| 86.7 | 4.0 \pm 1.1 | 11.7 \pm 0.8 | 25.2 \pm 1.6 | 0.3 \pm 0.2 | 3.9 \pm 2.2 | 9.3 \pm 2.1 | 0.5 \pm 0.3 | 45.0 \pm 5.4 | 44.8 | 55.0 |
| 101.2 | 2.1 \pm 0.4 | 10.3 \pm 0.9 | 25.3 \pm 0.2 | 0.5 \pm 0.1 | 7.0 \pm 0.3 | 11.6 \pm 0.8 | 0.9 \pm 0.2 | 42.3 \pm 0.7 | 44.8 | 55.4 |
| 136.0 | 7.3 \pm 0.7 | 15.6 \pm 0.3 | 20.6 \pm 0.3 | 0.2 \pm 0.0 | 2.3 \pm 0.3 | 6.6 \pm 0.2 | 0.3 \pm 0.2 | 47.1 \pm 1.2 | 45.8 | 54.2 |
| DF | | | | | | | | | | |
| 62.0 | 1.3 \pm 0.1 | 9.5 \pm 0.9 | 24.3 \pm 0.4 | 0.2 \pm 0.1 | 4.3 \pm 1.6 | 9.4 \pm 1.5 | 0.5 \pm 0.6 | 50.5 \pm 2.7 | 39.4 | 60.6 |
| 86.7 | 2.3 \pm 0.3 | 10.7 \pm 1.6 | 24.1 \pm 1.5 | 0.3 \pm 0.1 | 3.6 \pm 2.0 | 9.7 \pm 1.9 | 0.3 \pm 0.2 | 49.0 \pm 6.8 | 40.7 | 59.0 |
| 101.2 | 2.3 \pm 1.1 | 10.0 \pm 1.6 | 23.9 \pm 1.0 | 0.4 \pm 0.1 | 5.1 \pm 0.7 | 10.8 \pm 0.7 | 0.9 \pm 0.2 | 46.5 \pm 3.2 | 41.3 | 58.7 |
| 136.0 | 4.7 \pm 0.9 | 12.3 \pm 1.6 | 20.7 \pm 0.6 | 0.2 \pm 0.0 | 2.7 \pm 0.9 | 8.2 \pm 0.6 | 0.3 \pm 0.2 | 51.0 \pm 1.5 | 40.4 | 59.6 |

increase the DHA production and to concentrate this fatty acid, which will reduce the downstream purification costs. These conditions seem to be suitable for the large-scale DHA production from *C. cohnii*.

A new strategy to improve the DHA production from this microalgae in two-phase large-scale bioreactors is now in progress.

Acknowledgements The work was carried out with the support of FEDER funds, as a part of a study within the SAPIENS project POCTI/EQU/47689/2002 entitled "Enhancement of bubble and drop mass transfer processes using additives".

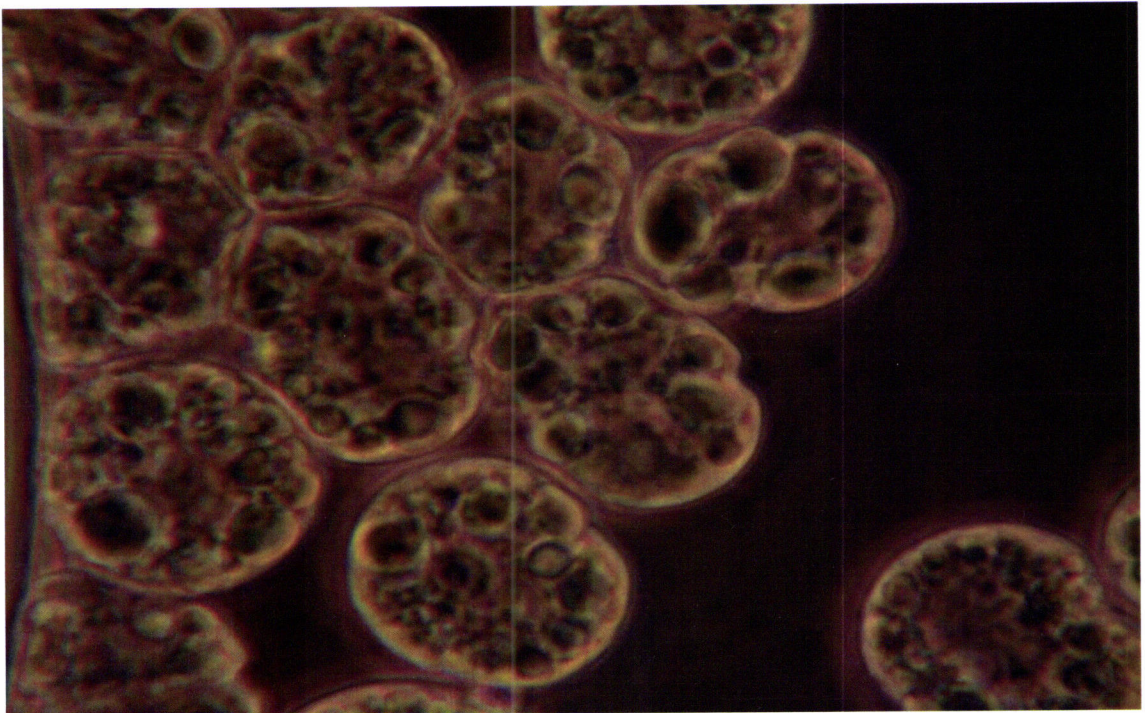
References

- Crawford MA, Costeloe K, Ghebremeskel, Phlactos A, Skirvin L, Stacey F (1997) Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of pre-term babies? *Am J Clin Nutr* 66:1032S–1041S
- Das UN, Fams MD (2003) Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory. *Nutrition* 19:62–65
- Nettleton JA (1992) Are *n*-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? *J Am Diet Assoc* 93:58–64
- Huisman M, vanBeusekom CM, Lanting CI, Nijeboer HJ, Miskiet FAJ, Boersma ER (1996) Triglycerides, fatty acids, sterols, mono-, and disaccharides and sugar alcohols in human milk and current types of infant formula milk. *Eur J Clin Nutr* 50:255–260
- Boswell K, Koskelo EK, Carl L, Glaza S, Hensen DJ, Williams KD, Kyle DJ (1996) Preclinical evaluation of single cell oils that are highly enriched with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Food Chem Toxicol* 34:585–593
- Wynn J, Behrens P, Sundararajan A, Hansen J, Apt K (2005) Production of single cell oils by dinoflagellates. In: Cohen Z, Ratledge C (eds) *Single cell oils*. AOCS press, Champaign, pp 86–98
- Carlson SE (1996) Arachidonic acid status of human infants: influence of gestational age at birth and diets with very long chain *n*-3 and *n*-6 fatty acids. *J Nutr* 126(Suppl):1092–1098
- Carlson SE, Werkam SH, Rhodes PG, Tolley EA (1993) Visual-acuity development in healthy preterm infants: effect of marine-oil supplementation. *Am J Clin Nutr* 58:35–42
- Medina A, Giménez A, Camacho F, Pérez J, Grima A, Gómez A (1995) Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and marine microalga *Isochrysis galbana*. *J Am Oil Chem Soc* 72:575–583
- Jiang Y, Chen F, Liang S (1999) Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Proc Biochem* 34:633–637
- Kyle DJ (1996) Production and use of a single-cell oil which is highly enriched in docosahexaenoic acid. *Lipid Technol* 8:107–110
- Kyle DJ, Sicotte VJ, Singer J, Reeb SE (1992) Bioproduction of docosahexaenoic acid (DHA) by microalgae. In: Kyle DJ, Ratledge C (eds) *Industrial applications of single cell oils*. American Oil Chemists' Society, Champaign, pp 287–300
- Sijtsma L, De Swaaf M (2004) Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:146–153
- Beach DH, Harrington GW, Gellerman JL, Schlenk H, Holz GG (1974) Biosynthesis of oleic acid and docosahexaenoic acid by a heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Biochim Biophys Acta* 369:6–24
- Bell MV, Henderson RJ (1990) Molecular species composition of phosphatidylcholine from *Cryptocodinium cohnii* in relation to growth temperature. *Lipids* 25:115–118
- Hejazi MA, Kleinegris D, Wijffels RH (2004) Mechanism of extraction of β -carotene from microalga *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 88:593–600
- Henderson RJ, Mackinlay EE (1991) Polyunsaturated fatty acid metabolism in the marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phytochemistry* 30:1781–1787
- Ratledge C, Streekstra H, Cohen Z, Fichtali J (2005) Downstream processing, extraction, and purification of single cell oils. In: Cohen Z, Ratledge C (eds) *Single cell oils*. AOCS press, Champaign, pp 202–219
- Tuttle RC, Loeblich AR (1975) An optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phycologia* 14:1–8
- Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86:807–815
- Beach DH, Holz GG (1973) Environmental influences on the docosahexaenoate content of the triacylglycerols and phosphatidylcholine of a heterotrophic, marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. *Biochim Biophys Acta* 316:56
- De Swaaf M, Sijtsma L, Pronk JT (2003) High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid production marine alga *Cryptocodinium cohnii*. *Biotechnol Bioeng* 81:666–672
- Yeung PKK, Wong JTY (2003) Inhibition of cell proliferation by mechanical agitation involves transient cell cycle arrest at G1 phase dinoflagellates. *Protoplasma* 220:173–178
- Nielson DR, Daugulis AJ, McLellan PJ (2003) A novel method of simulating oxygen mass transfer in two-phase partitioning bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 83:735–742
- Ho CS, Ju LK, Baddour R (1990) Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of *n*-hexadecane. *Biotechnol Bioeng* 36:1110–1118
- Menge M, Mukherjee J, Scheper T (2001) Application of oxygen vectors to *Claviceps purpurea* cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:411–416
- Galaction AI, Cascaval D, Turnea M, Folescu E (2005) Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors 2 *Propionibacterium shermanii* broths. *Bioprocess Biosyst Eng* 27:263–271
- Giridhar R, Srivastava A (2000) Productivity enhancement in L-sorbose fermentation using oxygen vector. *Enzyme Microb Technol* 27:537–541
- Jia S, Wang M, Kahar P, Park Y, Okabe M (1997) Enhanced of yeast fermentation by addition of oxygen vectors in air-lift bioreactors. *J Ferm Bioeng* 84:176–178
- Jialong W (2000) Enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* using *n*-dodecane as an oxygen vector. *Process Biochem* 35:1079–1083
- Lai L, Tsai T, Wang T (2002) Application of oxygen vectors to *Aspergillus terreus* cultivation. *J Biosci Bioeng* 94:453–459
- Wei DZ, Liu H (1998) Promotion of L-asparaginase production by using *n*-dodecane. *Biotechnol Tech* 12:129–131
- Lowe KC, Davey MR, Power JB (1998) Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. *Trends Biotechnol* 16:272–277
- MacLean GT (1977) Oxygen diffusion rates in organic fermentation broths. *Proc Biochem* 12:22–28
- Zhao S, Kuttava SG, Ju LK (1999) Oxygen transfer characteristics of multiple-phase dispersions simulating water-in-oil xanthan fermentations. *Bioproc Eng* 20:313–332
- Hejazi MA, Eijffels RE (2004) Milking of microalgae. *Trends Biotechnol* 22:189–194
- Özbek B, Gayik S (2001) The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Proc Biochem* 36:729–741
- Linek V, Benes P, Sinkule J, Moucha T (1993) Non-ideal pressure step method for k_{LA} measurement. *Chem Eng Sci* 48:1593–1599
- Moucha T, Linek V, Prokopová E (2003) Gas hold-up, mixing time and gas-liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine, pitched blade and techmix impeller and their combinations. *Chem Eng Sci* 58:1839–1846

40. Rols JL, Condoret JS, Fonade C, Goma G (1990) Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors. *Biotechnol Bioeng* 35:427–435
41. Guillard RL (1960) A mutant of *Chlamydomonas moewusii* lacking contractile vacuoles. *J Protozool* 7:262–269
42. Guillard RL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (eds) *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press, New York, pp 26–60
43. Guillard RL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms I *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can J Microbiol* 8:229–239
44. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
45. Lepage G, Roy CC (1986) Direct transmethylolation of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27:114–119
46. Doran P (1999) *Bioprocess engineering principles*. Academic, London
47. De Swaaf M, Rijk TC, Eggink G, Sijtsma L (1999) Optimization of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *J Biotechnol* 70:185–192
48. De Swaaf M, Pronk JT, Sijtsma L (2003) Fed-batch cultivation of docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:40–43
49. De Swaaf M, Rijk TC, Meer P, Eggink G, Sijtsma L (2003) Analysis of docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by ¹³C labelling and desaturase inhibitor experiments. *J Biotechnol* 103:21–29
50. Meyer A, Cirpus P, Ptt C, Schlecker R, Zähring U, Heinz E (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: biochemical and molecular evidence for the involvement of a Δ4-fatty acyl group desaturase. *Biochemistry* 42:9779–9788
51. Sonnenborn U, Kunay WH (1982) Purification and properties of the fatty acid synthase complex from the marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. *Biochem Biophys Acta* 712:523–524
52. Certík M, Andrási P, Sajbidor J (1996) Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing γ-linolenic acid extracted from fungi. *J Am Oil Chem Soc* 73:357–365

CHAPTER 5

DHA Concentration and Purification from the Marine Heterotrophic Microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by Winterization and Urea Complexation



Cryptocodinium cohnii (Seligo) CCMP 316. Ampliação (× 1000)

DHA Concentration and Purification from the Marine Heterotrophic Microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by Winterization and Urea Complexation

Ana Mendes, Teresa Lopes da Silva* and Alberto Reis

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Departamento de Biotecnologia, Unidade de Bioengenharia e Biotecnologia, Estrada do Paço do Lumiar 22, P-1649-038 Lisboa, Portugal

Received: January 9, 2006

Accepted: April 6, 2006

Summary

A simple and inexpensive procedure involving saponification and methylation in wet biomass, winterization and urea complexation in a sequential way has been developed in order to concentrate docosahexaenoic acid (DHA) from *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 biomass. Different urea/fatty acid ratios and crystallization temperatures were tested in the urea complexation method. ANOVA test revealed that, in the studied range, the temperature had the most significant effect on the DHA concentration. The highest DHA fraction (99.2 % of total fatty acids) was found at the urea/fatty acid ratio of 3.5 at the crystallization temperatures of 4 and 8 °C. The highest DHA recovery (49.9 %) was observed at 24 °C at the urea/fatty acid ratio of 4.0, corresponding to 89.4 % DHA of total fatty acids. Considering the high proportions of DHA obtained in the non-urea complexing fractions, the current procedure was an appropriate way to concentrate and purify DHA from *C. cohnii*.

Key words: DHA, PUFAs, *Cryptocodinium cohnii*, winterization, urea complexation

Introduction

Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω 3) is regarded to be essential for proper visual and neurological development of infants (1–3). Despite being an important polyunsaturated fatty acid (PUFA) in human breast milk, in the past DHA was generally absent from infant formulae (4). However, the World Health Organization (WHO), the British Nutritional Foundation (BNF), the European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) and the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL) have recognized the importance of DHA and arachidonic acid (AA) and recommended that long chain PUFA should be included in preterm infant formulae (5). Presently, over 50 % of all infant formulae in the U.S. contain a blend of DHA and AA (6).

Traditional source of omega-3 fatty acids is fish oil. However, the use of fish oil as a food additive is limited

due to problems associated with its typical fishy smell, unpleasant taste, and poor oxidative stability. Furthermore, the presence of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 ω 3) in fish oil is undesirable for application in infant food as this fatty acid is associated with neonate growth retardation (7,8). Moreover, fish oil ω 3-PUFA content fluctuates widely as the fish stocks are declining. Therefore, alternative sources are of interest. Microalgae biomass is particularly suitable for extraction and purification of individual PUFA due to its stable and reliable composition. In addition, PUFA from cultured microalgae are cholesterol-free, contaminant-free (e.g. heavy metals, polychlorobiphenyls (PCBs)) and taste good. Attempts have been made to produce DHA phototrophically by growing microalgae in photobioreactors, but it is difficult to achieve high biomass concentration and high DHA productivity (9). This is due to unsolved problems, namely limited light access and oxygen accumulation, in the photo-

*Corresponding author; Phone: ++351 21 09 24 600; Fax: ++351 21 71 63 636; E-mail: teresa.lopesilva@ineti.pt

autotrophic cultures (10). Screening of microalgae for heterotrophic production potential of DHA could therefore be of significance. The heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* is an interesting source for DHA production (11,12) and for research on DHA biosynthesis (6,13–16) due to its unique fatty acid composition. *C. cohnii* can accumulate relatively high amounts of lipids with 30–50 % DHA of the fatty acids and no other polyunsaturated fatty acid is present above 1 % (17). This characteristic makes the DHA purification process from this microorganism very attractive, particularly for pharmaceutical applications, since the inclusion of a PUFA as a drug component requires its purification to over 95 % (18).

There are several methods for concentration of ω 3-PUFA, but only few are suitable for large-scale production. Winterization has been used to fraction triglycerides with different melting points that are present in edible oils and involves the chilling of the oil to allow the solid portion to crystallize and the subsequent filtration of the two phases (19). The melting point of fatty acids changes considerably with the type and degree of unsaturation and thus separation of mixtures of saturated and unsaturated fatty acids may become possible. At low temperatures, long chain saturated fatty acids, which have higher melting points, crystallize out and PUFA remain in the liquid form (20).

Urea molecules readily form solid-phase complexes with saturated free fatty acids (FFA). In this way, PUFA and branched FFA may be separated from saturated FFA. Urea complexation seems to be one of the most appropriate methods for ω 3-PUFA enrichment: it allows the handling of large quantities of material in simple equipment, requires inexpensive solvents such as methanol or hexane, as well as milder conditions (*e.g.* room temperature), the separation is more efficient than with other methods such as fractional crystallization or selective solvent extraction, and the cost is lower (21,22). Moreover, urea complexation protects the ω 3-PUFA from autoxidation (20).

The present work aims at the concentration and purification of DHA from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* using the rapid, inexpensive and simple winterization and urea complexation methods in a sequential way. Freeze-drying is a very high energy and time consuming operation (23), difficult to be implemented at a large-scale. In the present work the fatty acid extraction was carried out from wet biomass rather than from lyophilized cells or the extracted oil, usually reported in the literature (9,22,24–27), which may represent a significant economical benefit compared with the traditional procedures. It is known that urea/fatty acid ratio and crystallization temperature strongly influence the efficiency of DHA purification process (28). In this way, different urea/fatty acid ratios and crystallization temperatures were used in order to achieve the best concentration and purification process efficiency. As far as we are aware, this is the first work wherein winterization and urea complexation have been used in a sequential way to concentrate DHA from *C. cohnii*.

Materials and Methods

Growth conditions

Cryptocodinium cohnii CCMP 316 was obtained from the Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) culture collection (Maine, USA) and was maintained in axenic conditions by subculturing every two weeks in the f/2+NPM medium (29–31) supplemented with glucose (6 g/L). Cultures were grown on 500 mL of the f/2+NPM medium supplemented with glucose (15 g/L) in 2-litre shake flasks at 120 rpm and 27 °C in the dark. Biomass was collected at the stationary phase (5 days) by centrifugation at 6000 rpm (8900 g) using an Avanti J-25I (Beckman Coulter, Fullerton, USA) for 15 min and then frozen for further experiments.

Saponification and transmethylation

A volume of 1116.5 mL of ethanol 96 % (by volume) and 23.5 g of KOH were added to 93.8 g of wet biomass (corresponding to 23.3 g of dry cell mass (DCM) and 20.6 g of ash free dry mass (AFDM)), according to Medina *et al.* (22). The mixture was incubated in an orbital shaker at 100 rpm and 20 °C overnight. Afterwards, 100 mL of distilled water were added, followed by several hexane extractions (5×200 mL) in order to separate the unsaponifiables. The hexane used in all these steps (saponification, transmethylation, winterization and urea complexation) contained 0.01 % (by mass per volume) of butylated hydroxytoluene (BHT) in order to prevent lipid degradation.

The hydroalcoholic phase, containing the soaps, was acidified to pH=1 by the addition of hydrochloride solution (1:1 by volume, HCl 37 % Merck, Darmstadt, Germany). Then the FFA were recovered by several extractions (8×200 mL) with hexane. The organic phase, containing the FFA, was dried with anhydrous sodium sulphate, and the solvent was evaporated in a vacuum rotary evaporator at 35 °C. The FFAs were then methylated according to Khozin-Goldberg *et al.* (32), with modifications, by adding 465.6 mL of the methylation mixture of methanol (Merck, Darmstadt, Germany) and H₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Germany) (49:1, by volume) and heating at 80 °C for 1 hour. After cooling to room temperature, 232.8 mL of water and the same volume of hexane were added and the upper hexane layer was removed and dried with anhydrous sodium sulphate. The solvent was evaporated in a vacuum rotary evaporator at 35 °C and *n*-hexane was added ($V=2.46$ mL).

Fatty acid analysis

Methyl esters were analyzed by gas-liquid chromatography on a Varian 3800 gas-liquid chromatograph (Palo Alto, USA), equipped with a flame ionization detector. Separation was carried out on a 0.32 mm × 30 m fused silica capillary column (film 0.32 μ m) Supelcowax 10 (Supelco, Bellefonte PA, USA) with helium as carrier gas at a flow rate of 3.5 mL/min. The column temperature was programmed at an initial temperature of 200 °C for 8 min, then increased at 4 °C/min to 240 °C and held there for 8 min. Injector and detector temperatures were 250 and 280 °C, respectively, and split ratio was 1:50. Peak

identification was carried out using known standards (Nu-Chek-Prep, Elysian, USA). Methylheptadecanoate ester (Merck, Darmstadt, Germany) was added as internal standard.

Winterization

The mixture containing the methyl esters was stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. Crystals were formed and afterwards the liquid fraction was separated from the crystals. The methyl esters of this fraction were quantified by GC as previously described, after the addition of 0.2 mL of methylheptadecanoate ester (5.3 mg/mL).

Urea complexation

Based on previous GC analysis of the winterized fraction containing the methyl esters, 41.0 and 35.9 μL of the liquid fraction and 0.45 mL of methanol were added to 0.105 g of urea in order to achieve an urea/fatty acid ratio of 3.5 and 4 (by mass), respectively, according to Medina *et al.* (22), and a methanol/urea ratio of 3.4 (by mass) (this methanol/urea ratio allowed a homogeneous and clear mixing of methyl esters with urea). The mixture was heated at $60\text{--}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stirred until the solution became clear. The urea complexes were obtained by cooling the solution at different temperatures (4, 8, 12, 20 and $24\text{ }^{\circ}\text{C}$) overnight, followed by an ultracentrifugation (centrifuge Sigma 2–26 K, Manchester, UK) at 14 000 rpm (20 800 g), at the respective complexation temperature, in order to separate the urea complexing from the non-urea complexing fractions. A volume of 0.5 mL of distilled water at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ was added to both fractions and vortexed, followed by the addition of 1 mL of hexane (with 0.01 % BHT by mass per volume) to extract the methyl esters. The hexane phases from both fractions (urea complexing and non-complexing) were collected and evaporated under nitrogen atmosphere for further GC analysis. Methylheptadecanoate ester was added as internal standard, as previously described.

DHA recovery

The DHA recovery of the winterization and urea complexation steps (expressed in percentage) was calculated from the following equation:

$$\text{DHA}_{\text{recovery}} = \left(\frac{(m_{\text{DHA}})_a}{(m_{\text{DHA}})_b} \right) \cdot 100 \quad /1/$$

where $(m_{\text{DHA}})_a$ is the DHA mass after the concentration/purification step and $(m_{\text{DHA}})_b$ is the DHA mass before the concentration/purification step.

Results and Discussion

In the present work, only one derivatization reaction (transmethylation rate of 98 %) was performed (Fig. 1). In this way, the methyl ester compositions of the extracts were compared under the same conditions (Tables 1 and 2).

A previous DHA concentration winterization step was carried out before the urea complexation step. According to Ganga *et al.* (33), this procedure is essential for subsequent urea precipitation, increasing the DHA pu-

urity. Table 1 shows *C. cohnii* cellular fatty acid composition before and after the winterization procedure in the liquid phase. The total fatty acid content of *C. cohnii* biomass was 9.9 % of DCM, which is similar to the one reported for *Isochrysis galbana* (9.5 %) (22). DHA was the major fatty acid (32.6 % of total fatty acids). The other major fatty acids were 12:0, 14:0, 16:0 and 18:1 ω 9. After the winterization procedure, the saturated fatty acid fraction dropped in the liquid phase, and 12:0 and 14:0 were the fatty acids which showed the strongest decrease (31 and 21 % of the initial values, respectively), whilst the unsaturated fatty acid fraction increased. DHA was the polyunsaturated fatty acid which showed the highest increase (26 % of the initial value) in the liquid phase and the recovery was 70.1 %.

Different urea/fatty acid ratios were used in the urea complexation, based on Medina *et al.* (22). These authors stated that the most efficient urea/fatty acid ratios for ω 3-PUFA concentration from cod liver oil were 3 and 4. Table 2 shows the fatty acid composition of urea complexing and non-urea complexing fractions at different urea/fatty acid ratios and crystallization temperatures. Urea alone crystallizes in a tightly packed tetragonal structure with channels of 5.67 \AA diameter. However, in the presence of long straight-chain molecules it crystallizes in a hexagonal structure with channels of 8–12 \AA diameter within the hexagonal crystals. In the presence of long-chain unbranched molecules, the formed channels are sufficiently large to accommodate aliphatic chains. The presence of double bonds in the carbon chain increases the bulk of the molecule and reduces the likelihood of its complexation with urea, thus monoenes are more readily complexed as compared to dienes, which, in turn, are more readily complexed than trienes (20,34). This explains why a large fraction of saturated and monounsaturated fatty acids was incorporated in the urea complexes (63.7–81.7 % of total fatty acids).

The saturated fatty acid which was present in the highest proportion in the non-urea complexing fraction was 12:0 (0.5–5.7 % of total fatty acids). In fact, shorter chain saturated fatty acids may not complex with urea during the crystallization process (35). The fractions of 14:0, 16:0, 16:1 ω 9 and 22:5 ω 3 in the non-urea complexing fraction were less than 2 % of total fatty acids; 18:0 was absent. As a result, non-urea complexing fractions with high proportions of DHA were obtained (89.4–99.2 % of total fatty acids).

A two factor analysis of variance (ANOVA) was performed on the data in order to find out which of the tested variables (urea/fatty acid ratio or temperature) had the most significant effect on the results. The ANOVA table decomposes the variability of data into contributions due to factors (21). Therefore, the variable that showed the most significant effect on the data was the temperature (F-ratio=22.32; $p=0.005$), when compared with the urea/fatty acid ratio (F-ratio=3.89; $p=0.12$), $\alpha=0.05$.

Wanasundara and Shahidi (28) used an experimental design to optimize the conditions that led to the maximum concentration of EPA and DHA from seal blubber oil, using the urea method concentration. The authors obtained 88.2 % of total ω 3 fatty acids at an urea/fatty acid ratio of 4.5, a crystallization time of 24 h and a

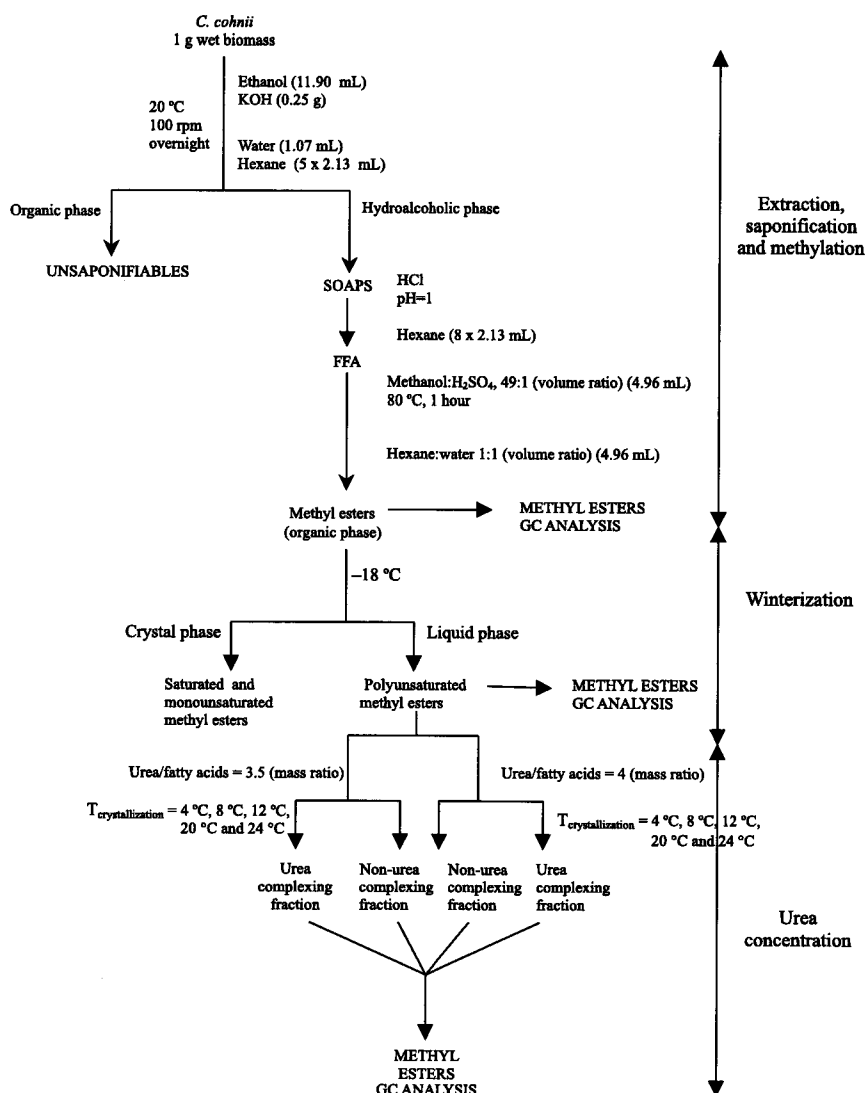


Fig. 1. Scheme for the DHA concentration and purification from *C. cohnii*

Table 1. *C. cohnii* fatty acid composition (total fatty acids/%) before winterization and in liquid fraction after winterization

| | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 16:1 ω 9 | 18:0 | 18:1 ω 9 | 22:5 ω 3 | 22:6 ω 3 |
|--|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Before winterization | 15.7 \pm 0.8 | 26.3 \pm 0.8 | 18.1 \pm 0.3 | 0.5 \pm 0.0 | 1.2 \pm 0.0 | 5.6 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.0 | 32.6 \pm 1.8 |
| After winterization (in liquid fraction) | 10.8 \pm 0.64 | 20.78 \pm 0.28 | 17.0 \pm 0.06 | 0.4 \pm 0.2 | 1.3 \pm 0.0 | 6.1 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 41.0 \pm 0.5 |

Data are represented as the average \pm standard deviation of two GC injections

crystallization temperature of -10 °C. However, the DHA purification usually requires a further preparative HPLC step. Grima *et al.* (36) used the urea complexation method to concentrate PUFAs from the marine microalga *Isochrysis galbana* biomass fatty acids, at the urea/fatty acid ratio of 4 and 4 °C. The stearidonic acid (SA), EPA and DHA separation was then obtained by HPLC and the SA, EPA and DHA fraction purities were 94.8, 96.0 and 94.9 %, respectively. Such purification steps are not easily implemented at a large scale. In the present work, the fractions with the highest DHA fraction (99.2 % of total fatty acids) were obtained at the urea/fatty acid ratio of 3.5, and the temperatures of 4 and 8 °C (Table 2, Fig. 2a). Fractions with such proportions of DHA may not require further purification steps, which are of major concern in

an industrial bioprocess, since they are usually the most expensive. After this maximum, the DHA fraction steadily decreased, reaching a minimum at 24 °C (93.0 % at the urea/fatty acid ratio of 3.5 and 89.4 % at the urea/fatty acid ratio of 4).

As expected, the DHA fractions of total fatty acids in the urea complexing fractions (18.2–35.8 %) were much lower than those found in the non-urea complexing fractions. However, these fractions decreased with the increase of temperature (from 4 to 8 °C), remaining almost unchanged at higher temperatures (Fig. 2b).

As stated before (36), purity is susceptible to improvement only at the expense of a decrease in yield. This is exemplified in Fig. 3, where DHA recoveries in both

Table 2. Fatty acid composition (total fatty acids/%) of both urea complexing and non-urea complexing fractions as a function of the urea/fatty acid ratio and crystallization temperature

| | Urea/Fatty acids (by mass ratio) | Crystallization temperature/°C | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 16:1 ω 9 | 18:0 | 18:1 ω 9 | 22:5 ω 3 | 22:6 ω 3 |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Urea complexing fraction | 3.5 | 4 | 15.3 \pm 1.4 | 23.5 \pm 2.1 | 16.8 \pm 1.4 | 0.5 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.1 | 6.4 \pm 0.6 | 0.3 \pm 0.1 | 35.8 \pm 5.0 |
| | | 8 | 18.8 \pm 1.6 | 29.8 \pm 2.6 | 21.1 \pm 1.7 | 0.4 \pm 0.2 | 1.5 \pm 0.1 | 7.7 \pm 0.4 | 0.1 \pm 0.0 | 20.5 \pm 4.8 |
| | | 12 | 18.6 \pm 1.6 | 30.8 \pm 0.6 | 22.4 \pm 1.2 | 0.5 \pm 0.0 | 1.6 \pm 0.2 | 7.8 \pm 0.6 | 0.1 \pm 0.0 | 18.2 \pm 0.8 |
| | | 20 | 16.8 \pm 1.5 | 30.8 \pm 1.3 | 23.2 \pm 0.3 | 0.5 \pm 0.1 | 1.7 \pm 0.0 | 8.6 \pm 0.2 | 0.1 \pm 0.0 | 18.4 \pm 2.6 |
| | | 24 | 15.9 \pm 1.1 | 31.0 \pm 0.4 | 22.5 \pm 1.2 | 0.4 \pm 0.0 | 1.6 \pm 0.2 | 8.5 \pm 0.5 | 0.1 \pm 0.0 | 19.9 \pm 0.6 |
| | 4 | 4 | 17.6 \pm 1.1 | 26.9 \pm 2.1 | 19.7 \pm 1.2 | 0.6 \pm 0.0 | 1.4 \pm 0.1 | 6.8 \pm 0.4 | 0.2 \pm 0.1 | 32.8 \pm 4.5 |
| | | 8 | 18.5 \pm 1.7 | 29.6 \pm 1.6 | 21.7 \pm 2.1 | 0.6 \pm 0.4 | 1.6 \pm 0.2 | 7.8 \pm 0.3 | 0.1 \pm 0.0 | 20.2 \pm 4.4 |
| | | 12 | 17.6 \pm 1.5 | 29.0 \pm 0.6 | 21.4 \pm 1.0 | 0.5 \pm 0.0 | 1.6 \pm 0.2 | 8.3 \pm 0.6 | 0.1 \pm 0.0 | 21.42 \pm 0.5 |
| | | 20 | 15.8 \pm 1.5 | 29.8 \pm 1.6 | 24.4 \pm 1.4 | 0.4 \pm 0.0 | 1.8 \pm 0.1 | 8.0 \pm 0.3 | 0.1 \pm 0.0 | 19.6 \pm 4.5 |
| | | 24 | 11.4 \pm 2.8 | 29.0 \pm 2.0 | 27.1 \pm 2.4 | 0.3 \pm 0.0 | 2.3 \pm 0.4 | 8.7 \pm 1.1 | 0.1 \pm 0.1 | 21.1 \pm 1.4 |
| Non-urea complexing fraction | 3.5 | 4 | 0.5 \pm 0.2 | 0.1 \pm 0.2 | 0.1 \pm 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0.1 \pm 0.1 | 99.2 \pm 0.3 |
| | | 8 | 0.5 \pm 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 \pm 0.0 | 99.2 \pm 0.2 |
| | | 12 | 1.3 \pm 0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | 98.3 \pm 0.6 |
| | | 20 | 3.3 \pm 1.3 | 0.3 \pm 0.1 | 0 | 0.2 \pm 0.1 | 0 | 0.6 \pm 0.4 | 0.3 \pm 0.0 | 95.2 \pm 1.9 |
| | | 24 | 4.4 \pm 0.6 | 0.6 \pm 0.1 | 0 | 0.3 \pm 0.0 | 0 | 1.4 \pm 0.2 | 0.2 \pm 0.2 | 93.0 \pm 1.1 |
| | 4 | 4 | 0.6 \pm 0.2 | 0.1 \pm 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 \pm 0.0 | 99.0 \pm 0.2 |
| | | 8 | 1.0 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 \pm 0.1 | 98.5 \pm 0.2 |
| | | 12 | 1.4 \pm 0.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | 98.1 \pm 0.7 |
| | | 20 | 4.1 \pm 0.8 | 0.6 \pm 0.4 | 0.1 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | 0 | 1.2 \pm 0.7 | 0.4 \pm 0.0 | 93.3 \pm 2.0 |
| | | 24 | 5.7 \pm 0.3 | 1.7 \pm 1.5 | 0.1 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.0 | 0 | 2.6 \pm 0.1 | 0.4 \pm 0.0 | 89.4 \pm 0.4 |

Data are represented as the average \pm standard deviation of two independent replications and four GC injections

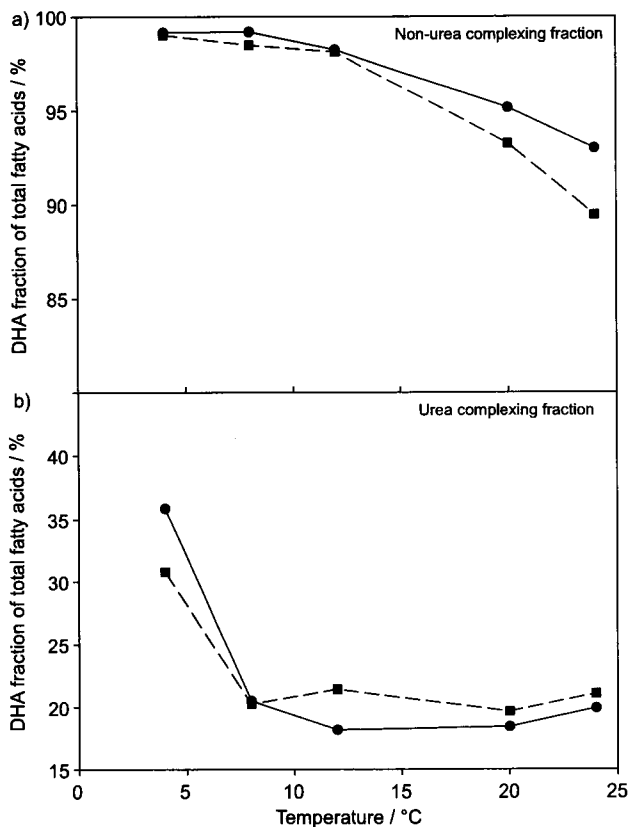


Fig. 2. DHA percentage of total fatty acids in the non-urea complexing (a) and urea complexing (b) fractions, at different crystallization temperatures and urea/fatty acid ratios
 ● U/FA = 3.5 (mass ratio)
 ■ U/FA = 4.0 (mass ratio)

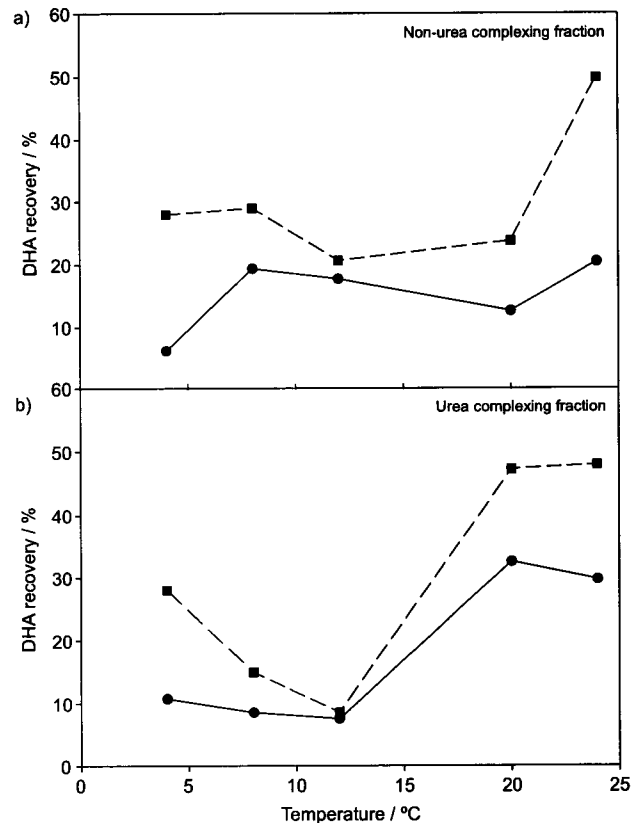


Fig. 3. DHA recoveries in the non-urea complexing (a) and urea complexing (b) fractions at different crystallization temperatures and urea/fatty acid ratios
 ● U/FA = 3.5 (mass ratio)
 ■ U/FA = 4.0 (mass ratio)

non-urea complexing and urea complexing fractions are plotted against temperature, at different urea/fatty acid ratios. Lower DHA recoveries in the non-urea complexing fractions (4–12 °C) corresponded to higher DHA fractions (of total fatty acids), whereas higher DHA recoveries (24 °C) were obtained at lower DHA fractions (Figs. 2 and 3). The highest DHA recovery (49.9 %) was obtained at 24 °C, at the urea/ratio of 4.0, corresponding to 89.4 % of DHA of total fatty acids. Bearing this in mind, a new serial urea complexation recycling steps could be applied to the urea complexing fraction in order to recover the DHA mass in this fraction (47 % of the initial DHA mass), increasing the DHA proportion in the non-urea complexing fraction. In this way, the urea could be recovered and used in further purification cycles and the overall DHA recovery of the urea complexation step could be increased.

The fractions with the highest proportion of DHA (99.2 % of total fatty acids) corresponded to DHA recoveries of 6.2 % (4 °C) and 19.4 % (8 °C) (Figs. 2 and 3). Obviously, the best conditions to produce DHA depend on the end use of the product. Pharmaceutical applications require DHA purity above 95 %, as already mentioned, thus the DHA fractions obtained in this work with purity higher than 95 % may be suitable for this purpose.

Senanayake and Shahidi (27) concentrated DHA from the oil extracted from the microalga *C. cohnii* and reported a DHA enrichment from 47.4 to 97.1 % with a process yield of 32.5 % of the mass of the original algal oil. However, the present work presents an alternative fatty acid extraction, saponification and methylation process carried out in wet biomass that may represent a significant economical benefit when compared with the traditional procedures (usually carried out in extracted oils or lyophilized cells), which are expensive and time consuming. Moreover, this inexpensive and simple DHA purification method can be easily scaled-up from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*.

Conclusions

The current procedure (saponification and methylation performed in wet biomass, winterization and urea complexation in a sequential way) is an appropriate way for concentration and purification of DHA from *C. cohnii*, considering the high proportions of DHA obtained in non-urea complexing fractions.

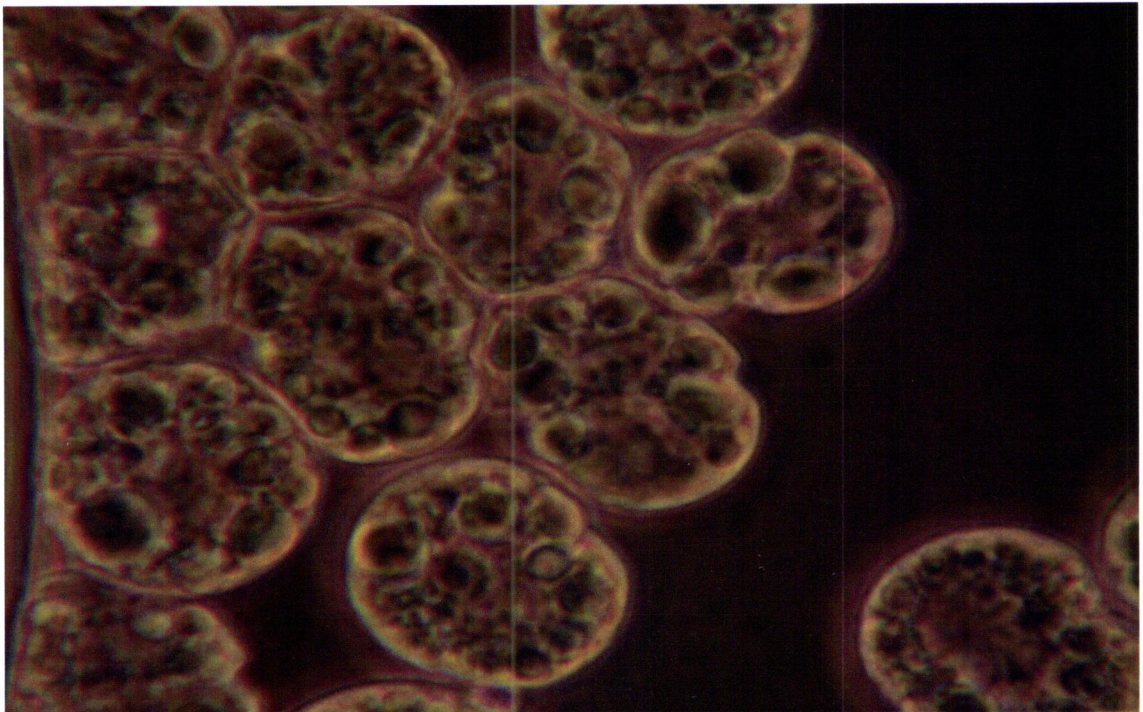
References

1. M.A. Crawford, K. Costeloe, K. Ghebremeskel, A. Phylactos, L. Skirvin, F. Stacey, Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neutral and vascular complications of pre-term babies?, *Am. J. Clin. Nutr.* (Suppl.), 66 (1997) 1032–1041.
2. U.N. Das, M.D. Fams, Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory, *Nutrition*, 19 (2003) 62–65.
3. J.A. Nettleton, Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development?, *J. Am. Diet. Assoc.* 93 (1992) 58–64.
4. M. Huisman, C.M. van Beusekom, C.I. Lanting, H.J. Nijboer, F.A.J. Muskiet, E.R. Boersma, Tryglicerides, fatty acids, sterols, mono-, and disaccharides and sugar alcohols in human milk and current types of infant formula milk, *Eur. J. Clin. Nutr.* 50 (1996) 255–260.
5. K. Boswell, E.K. Koskelo, L. Carl, S. Glaza, D.J. Hensen, K.D. Williams, D.J. Kyle, Preclinical evaluation of single cell oils that are highly enriched with arachidonic acid and docosahexaenoic acid, *Food Chem. Toxicol.* 34 (1996) 585–593.
6. J. Wynn, P. Behrens, A. Sundararajan, J. Hansen, K. Apt: Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates. In: *Single Cell Oils*, Z. Cohen, C. Ratledge (Eds.), AOCS Press, Champaign, Illinois, USA (2005) pp. 87–98.
7. S.E. Carlson, S.H. Werkam, P.G. Rhodes, E.A. Tolley, Visual-acuity development in healthy preterm infants: Effect of marine-oil supplementation, *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (1993) 35–42.
8. S.E. Carlson, Arachidonic acid status of human infants: Influence of gestational age at birth and diets with very long chain n-3 and n-6 fatty acids, *J. Nutr.* (Suppl.), 126 (1996) 1092–1098.
9. E.M. Grima, J.A.S. Perez, F.G. Camacho, J.L. Sánchez, D.L. Alonso, n-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 (1993) 599–605.
10. Y. Jiang, F. Chen, S. Liang, Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*, *Process Biochem.* 34 (1999) 633–637.
11. D.J. Kyle, Production and use of a single-cell oil which is highly enriched in docosahexaenoic acid, *Lipid Technol.* 8 (1996) 107–110.
12. D.J. Kyle, V.J. Sicotte, J.J. Singer, S.E. Reeb: Bioproduction of Docosahexaenoic Acid (DHA) by Microalgae. In: *Industrial Applications of Single Cell Oils*, D.J. Kyle, C. Ratledge (Eds.), American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, USA (1992) pp. 287–300.
13. D.H. Beach, G.W. Harrington, J.L. Gellerman, H. Schlenk, G.C. Holz, Biosynthesis of oleic acid and docosahexaenoic acid by a heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*, *Biochim. Biophys. Acta*, 369 (1974) 16–24.
14. R.J. Henderson, J.W. Leftley, J.R. Sargent, Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*, *Phytochemistry*, 27 (1988) 1679–1683.
15. M.V. Bell, R.J. Henderson, Molecular species composition of phosphatidylcholine from *Cryptocodinium cohnii* in relation to growth temperature, *Lipids*, 25 (1990) 115–118.
16. R.J. Henderson, E.E. Mackinlay, Polyunsaturated fatty acid metabolism in the marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*, *Phytochemistry*, 30 (1991) 1781–1787.
17. M.E. De Swaaf, L. Sijtsma, J.P. Pronk, High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*, *Biotechnol. Bioeng.* 81 (2003) 666–672.
18. C. Ratledge, H. Streekstra, Z. Cohen, J. Fichtali: Down-Stream Processing, Extraction, and Purification of Single Cell Oils. In: *Single Cell Oils*, Z. Cohen, C. Ratledge (Eds.), AOCS Press, Champaign, Illinois, USA (2005) pp. 202–219.
19. J.C. López-Martínez, P. Campra-Madrid, J.L. Guil-Guerrero, γ -Linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Ecium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization, *J. Biosci. Bioeng.* 97 (2004) 294–298.
20. F. Shahidi, U.N. Wanasundara, Omega-3 fatty acid concentrates: Nutritional aspects and production technologies, *Trends Food Sci. Technol.* 9 (1998) 230–240.
21. J.L. Guil-Guerrero, E. Belarbi, Purification process for cod liver oil polyunsaturated fatty acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 477–484.
22. A.R. Medina, A. Giménez, F. Camacho, J.A. Pérez, E. Grima, A. Gómez, Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 575–583.
23. G. Donsi, G. Ferrari, P. Di Matteo, Utilization of combined processes in freeze-drying of shrimps, *Food Bioprod. Process.* 79 (2001) 152–159.

24. T. Yokochi, M.T. Usita, Y. Kamisaka, T. Ankara, O. Suzuki, Increase in the γ -linolenic acid content by solvent winterization of fungal oil extracted from *Mortierella* genus, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67 (1990) 846–851.
25. R. Vazhappily, F. Chen, Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1996) 393–397.
26. M.E. de Swaaf, T.C. de Rijk, G. Eggink, L. Sijtsma, Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*, *J. Biotechnol.* 70 (1999) 185–192.
27. S.P. Senanayake, F. Shahidi, Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) from algal oil *via* urea complexation, *J. Food Lipids*, 7 (2000) 51–61.
28. U. Wanasundara, F. Shahidi, Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: Optimization of reaction conditions, *Food Chem.* 65 (1999) 41–49.
29. R.L. Guillard, A mutant of *Chlamydomonas moewusii* lacking contractile vacuoles, *J. Protozool.* 7 (1960) 262–269.
30. R.L. Guillard, J.H. Ryther, Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve, *Can. J. Microbiol.* 8 (1962) 229–239.
31. R.L. Guillard: Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals*, W.L. Smith, M.H. Chanley (Eds.), Plenum Press, New York, USA (1975) pp. 26–60.
32. I. Khozin-Goldberg, C. Bigogno, Z. Cohen, Salicylhydroxamic acid inhibits delta 6 desaturation in the microalga *Porphyridium cruentum*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1439 (1999) 384–394.
33. A. Ganga, S. Nieto, J. Sanhuez, C. Romo, H. Speisky, A. Valenzuela, Concentration and stabilization of n-3 polyunsaturated fatty acids from sardine oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 733–736.
34. M. Zhu, P.P. Zhou, L.J. Yu, Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids, *Bioresour. Technol.* 84 (2000) 93–95.
35. W.M.N. Ratnayake, B. Olisson, D. Matthews, R.G. Ackman, Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oils *via* urea complexation, *Fat Sci. Technol.* 90 (1988) 381–386.
36. E. Grima, J. Pérez, F. Camacho, A. Medina, A. Giménez, D. Alonso, The production of polyunsaturated fatty acids by microalgae: From strain selection to product purification, *Process Biochem.* 30 (1995) 711–719.

CHAPTER 6

Cryptocodinium cohnii with emphasis on DHA production: a review



Cryptocodinium cohnii (Seligo) CCMP 316. Ampliação (× 1000)

Cryptocodinium cohnii with emphasis on DHA production: a review

Ana Mendes · Alberto Reis · Rita Vasconcelos ·
Pedro Guerra · Teresa Lopes da Silva

Received: 30 January 2008 / Revised and accepted: 19 May 2008 / Published online: 17 August 2008
© Springer Science + Business Media B.V. 2008

Abstract Docosahexaenoic acid (DHA) is a polyunsaturated fatty acid (PUFA) that belongs to the ω -3 group. In recent years, DHA has attracted much attention because of its recognized beneficial effect on human health. At present, fish oil is the major source of DHA, but it may be produced by microorganisms with additional benefits. Marine microorganisms may contain large amounts of DHA and are considered a potential source of this important fatty acid. Some of these organisms can be grown heterotrophically on organic substrates without light, offering the possibility of greatly increasing microalgal cell concentration under controlled and monitored conditions, resulting in a very high quality product. Among the heterotrophic marine dinoflagellates, *Cryptocodinium cohnii* has been identified as a prolific producer of DHA. The organism is extraordinary in that it produces no other PUFAs than DHA in its cell lipid in any significant amount, which makes the DHA purification process very attractive, particularly for pharmaceutical and nutraceutical applications. This paper reviews recent advances in the biotechnological production of DHA by *C. cohnii*.

Keywords *Cryptocodinium cohnii* · Dinoflagellates · Docosahexaenoic acid (DHA) · Polyunsaturated fatty acids PUFAs

A. Mendes · A. Reis · R. Vasconcelos · P. Guerra ·
T. Lopes da Silva (✉)
Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI),
Departamento de Biotecnologia,
Unidade de Bioengenharia e Bioprocessos,
Estrada do Paço do Lumiar, 22,
1649-038 Lisboa, Portugal
e-mail: teresa.lopesilva@ineti.pt

Introduction

It is well known that both coronary heart disease and depression have exploded with Westernization, concomitant with changes in diet including declining intake of performed docosahexaenoic acid (DHA) (Joordens et al. 2007).

In fact, the role of DHA and other ω -3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) in alleviating cardiovascular diseases has been shown in hundreds of in vivo and in vitro experiments apart from several clinical trials (Connor 2000). Both eicosapentaenoic acid (EPA) and DHA lower blood pressure and prevent the development of hypertension, one of the critical factors resulting in cardiovascular pathologies like atherosclerosis or stroke (Narayan et al. 2006).

In an experiment involving human subjects with hypertension and diabetes, it was found that higher DHA levels in blood platelet membranes resulted in significantly lower diastolic blood pressure and higher heart rate variability as compared to the control group, which had low DHA levels in the blood platelet membranes (Christensen et al. 2001). Li et al. (2003) stated that an adequate intake of ω -3 fatty acids including DHA at an early stage in life prevents increased blood pressure in later life in humans. In addition, data from intervention trials are consistent in suggesting that ω -3 LCPUFAs lower the risk of cardiovascular diseases, probably by the multiple mechanisms of lowering serum triacylglycerols, improving the LDL:HDL ratio, anti-arrhythmic effects on heart muscle, improved plaque stability, anti-thrombotic effects and reduced endothelial activation (Ruxton et al. 2005).

Compared to blood pressure, the etiology of cancer is complicated and multi-factorial apart from being uncertain. Nevertheless, a strong positive relationship between dietary fat intake and/or body fat and the manifestation of cancer

has been clearly established (Carroll 1986). DHA and EPA inhibit cyclooxygenase, thereby reducing the amount of prostaglandins and increasing the lipoxygenase activity. This in turn results in higher production of hydroxyeicosatrienoic acids (HETE) and leukotriene B4 (LTB4), which have been suggested as retarding the process of cancerous cells taking over a tissue. In an experimental animal model, DHA was found to be more effective than EPA in inhibiting transcription factor activator protein 1 (AP-1), which has been implicated in the development of cancer (Liu et al. 2001).

In recent years, several case-control studies and clinical trials have shown that long chain ω -3 PUFAs, mainly EPA and DHA, play a very important role in neuropsychiatry performance. By effectively regulating the plasma/serum cholesterol that is associated with an increased risk of depression and suicide, these LCPUFAs aid in the prevention of neuropsychiatric disorders (Hibbeln and Salem 1995; Narayan et al. 2006).

The role of EPA and DHA in reducing the risk of neuropsychiatric disorders could be attributed to their effect on neurotransmitter receptor and G-proteins via effects on the biophysical properties of cell membranes and secondary messengers, and on protein kinases (Hibbeln and Salem 1995; Edwards and Peet 1999; Narayan et al. 2006).

A number of dietary-, ocular- (optical, retinal) and cerebral cortex-based factors have been suggested to influence the development of acuity; among the dietary factors is early postnatal intake of ω -3 LCPUFAs (SanGiovanni et al. 2000). In particular, DHA is regarded as essential for proper visual and neurological development of infants (Crawford et al. 1997; Das and Fams 2003; Nettleton 1992).

Maternal and preconceptional, prenatal and postnatal dietary balance and composition of essential fatty acids (EFA)/LCPUFAs influence the quantity of DHA available to the human fetus and milk-fed infant. Dietary DHA is more likely to be efficiently transferred from the mother to the fetus or young infant than the DHA that is synthesized from ω -3 EFAs (Crawford 1993). Therefore, dietary intake is the only practical means for the young infant to attain adequate LCPUFAs tissue status. In fact, the World Health Organization, the British Nutritional Foundation, the European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, and the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids have recognized the importance of DHA and arachidonic acid (AA) and recommended that LCPUFAs should be included in all infant formulas (Boswell et al. 1996). Presently, over 50% of all infant formulas in the United States contain a blend of DHA and AA (Wynn et al. 2005).

The actual recommended daily intake of DHA is 120 mg per day for men and 100 mg for women and 100 mg for aged people (Bourre 2005). Nevertheless, it is recognised

that there is a lack of dietary ω -3 fatty acids in occidental countries. In order to prevent different pathologies, mainly cardiovascular diseases, and more lately some psychiatric disorders, an appropriate dietary level of ω -3 fatty acids is required, more specifically during development and aging. One way to meet this requirement is enriching food products (meat, butter, milk and dairy products, cheese and eggs, etc.) in ω -3 fatty acids (Bourre 2005). For instance, numerous animal feeding trials have been carried out using different species and breeds aiming at bringing the polyunsaturated fatty acid/saturated fatty acid (P/S) ratio of meat close to the recommended value (>0.7) (Raes et al. 2004). Bourre (2005) reported that by feeding animals with fish extracts or algae oils, the level of DHA was increased about 2-fold in beef, 7-fold in chicken, 6-fold in eggs, and 20-fold in fish (salmon). The author suggested that regulations governing the scheduling, raw materials and food programs should not just define minimum contents of toxic substances, but also define the real nutritional value of foodstuffs, which must nourish but not poison.

The traditional source of ω -3 fatty acids is fish oil. The major findings regarding this ω -3 source that received international recognition arose from reports from Danish scientists investigating the reasons why cardiovascular problems seemed nonexistent, or at least significantly less, in Greenland Eskimos compared to other populations in spite of the very high intake of fat by the Eskimos. A low incidence of heart disease in other fish-eating populations of Norwegians and Japanese also helped to focus attention on the importance of DHA and EPA being the two major PUFAs of fish oils (Ratledge 2005).

However, the use of fish oil as a food additive is limited due to problems associated with its typical fishy smell, unpleasant taste, and poor oxidative stability. Fish oil supply is difficult to predict, especially in the long term, with declining fish stocks in many of the world's oceans. In addition, the International Fishmeal and Oil Manufacturers Association estimates that inclusion of fish oil in aquaculture feeds will rise to 1,133,000 tons in 2010. This aquafeed demand in 2010 could result in a worldwide undersupply of fish oil. Moreover, the presence of EPA in fish oil is undesirable for application in infant food, as this fatty acid is associated with neonate growth retardation. In addition, serious questions remain about the possible contamination of fish oils with heavy metals and other pollutants (Carlson and Wilson 1994).

Microalgae biomass is particularly suitable for the extraction and purification of individual PUFAs due to its stable and reliable composition. In addition, PUFAs from cultured microalgae are cholesterol free, contaminant free [e.g. heavy metals, polychlorobiphenyls (PCBs)], and taste good (Medina et al. 1995). Van Beelen et al. (2007) com-

pared the mode of action of algal oils (including the microalga *Cryptocodinium cohnii*) and fish (menhaden) oil on cancer cells in vitro, and found similar results.

Attempts have been made to produce DHA phototrophically by growing microalgae in photobioreactors, but it is difficult to achieve high biomass concentration and high DHA productivity. This is due to unsolved problems, namely light limitation and oxygen accumulation, in photoautotrophic cultures (Jiang et al. 1999).

Large-scale production of algal fatty acids is possible through the use of heterotrophic algae using traditional fermentation systems which provide consistent biomass under highly controlled and monitored conditions resulting in a very high quality product. Fermentation runs last a matter of days, so production can be increased or decreased to match market requirements. In addition, there is no climatic or seasonal dependence. Hence, screening of microalgae for heterotrophic production of DHA is of potential significance. Among the heterotrophic marine dinoflagellate microalgae, *C. cohnii* was identified as a prolific producer of DHA. The organism is extraordinary in that it produces no other PUFAs other than DHA in its cell lipid in any significant amount (Van Pelt et al. 1999).

Habitat

Cryptocodinium cohnii appears to be a species complex, composed of many reproductively isolated sibling species (Beam and Himes 1982). This microalga is brackish, littoral (Sournia 1986) and neritic (Himes and Beam 1975; Beam and Himes 1987). It is often present among macrophytes, particularly *Fucus* spp. (Ucko et al. 1997). Nevertheless, *Fucus* does not always yield *C. cohnii* (Beam and Himes 1977). In nature, this dinoflagellate also occurs among other decaying seaweeds (Ucko et al. 1997).

Cryptocodinium cohnii and its sibling species have also been isolated from other types of hosts like *Macrocystis*, *Sargassum* (Beam and Himes 1977, 1982), *Cystoseira*, *Zostera*, *Thalassia*, *Phragmites* and *Acetabularia* (Beam and Himes 1982).

Cryptocodinium cohnii-like dinoflagellates have been obtained from various habitats including open ocean beaches, polluted brackish bays and estuaries, steaming mangrove swamps and frozen New England harbors. Nevertheless, the strains of essentially globally dispersed dinoflagellates resembling *C. cohnii* are not members of the same gene pool (Himes and Beam 1978).

Cryptocodinium cohnii and *C. cohnii* sibling species are dispersed in temperate and tropical waters (Beam and Himes 1982). They are found from the North Sea to the Caribbean (Sournia 1986), and also in the Mediterranean Sea, the Baltic

Sea, and the Atlantic, Pacific (Beam and Himes 1977) and Indian Oceans (Beam and Himes 1982).

The geographic distribution is difficult to interpret. Although the swimmers are motile, their speed ($1 \text{ km} \cdot \text{y}^{-1}$) must render their intrinsic vagility secondary to other agents of dispersion. They must have been affected by tides and currents, especially through rafting on fragments of macrophytes (Beam and Himes 1982).

Taxonomy

In 1753, the first modern dinoflagellates were described by Baker and named by Muller in 1773. The term derives from the Greek word δῖνος (dinos), meaning 'whirling,' and Latin flagellum, a diminutive term for a whip or scourge.

Dinoflagellates are an important group of phytoplankton in marine waters. These microorganisms are eukaryotes that have kept several prokaryotic features, and have some unique characteristics such as a permanent nuclear envelope, chromosomes condensed throughout the cell cycle and the lack of histones and nucleosomes. The mitotic microtubular spindle is extranuclear, and passes through the nucleus via cytoplasmic channels (Moreau et al. 1998).

Dinoflagellate nomenclature is controversial. Traditionally, they were regarded as protozoans (one-celled animals) by some scientists and as one-celled algae (plants) by others. Currently, dinoflagellates are classified as Alveolates which are unicellular protists.

Cryptocodinium cohnii was described by Seligo (1885) as *Glenodinium cohnii*. Seligo provided good drawings showing the morphology of the cell with the characteristic cingulum, which is much displaced and does not form a complete loop around the body. Schiller (1933) transferred this organism to the genus *Gyrodinium* (Kofoid and Swezy 1921) as *Gyrodinium cohnii* (Seligo) Schiller. Biecheler (1952) described the new genus with the single species *Cryptocodinium setense* Biecheler, characterized by the presence of very thin thecal plates which could be demonstrated only by a special staining method. The cell morphology is very similar to that of *Gyrodinium cohnii*, and Biecheler (1952) already suspected the possible synonymy of the two organisms. Chatton (1952) regarded them as conspecific and introduced the combination *Cryptocodinium cohnii* (Seligo) Chatton. Since then, flagellates of this morphotype have been isolated several times and have been called *Cryptocodinium cohnii*. Ucko et al. (1989, 1997) reported a *C. cohnii*-like dinoflagellate occurring as a deleterious contaminant in commercial pond cultures of *Porphyridium* sp., a unicellular red alga, in Elat, Israel. Parrow et al. (2006) reported a heterotrophic dinoflagellate in a brackish-water fish aquarium at North Carolina State University, USA,

which was very similar to that described by Ucko et al. (1997) and fitted with Biecheler's description of *C. setense*. This study provided the first clear demonstration of the plate tabulation of a *Cryptothecodinium* species, by scanning electron microscopy (SEM).

Cryptothecodinium cohnii apparently represents a supra-species encompassing several biological species (Beam and Himes 1977; Beam et al. 1993).

Morphology

Two forms of *C. cohnii* have been reported, swimming cells and cysts (Bhaud et al. 1991) with different dimensions. The swimming cells show velocities of the order of 1 km.y^{-1} (Beam and Himes 1982). The motile swimming cells have two unequal flagella. One is a flattened, ribbon-like flagellum, which encircles completely or partially the cell in a transverse groove, providing propulsive and spinning force for the cell. The other flagellum is directed posteriorly along a longitudinal groove and presumably acts like a rudder for steering. The flagella are inserted in two sulci (transverse-cingulum and longitudinal-sulcus, respectively) (Hackett et al. 2004). That part of the cell (whether cyst, thecate motile cell or athecate motile cell) anterior to the cingulum is termed the episome; the part of the cell posterior to the cingulum is termed the hyposome (Fensome et al. 1993). The schematic representation of *C. cohnii* by Perret et al. (1993) shows that the cingulum almost completely girdles the cell, as can be seen in Fig. 1. However, this schematic representation differs from the original description (Seligo 1885) in which the cingulum is much displaced and does not form a complete loop around the body (Ucko et al. 1997). Parrow et al. (2006) showed a scanning electron micrograph of a *Cryptothecodinium* species in which the cingulum does not fully encircle the cell, traversing roughly two-thirds of the cell circumference (Fig. 2).

Cryptothecodinium cohnii is a dinoflagellate with very delicate theca (15–20 μm) (Kubai and Ris 1969) whose plates are mainly composed of cellulose (Kwok and Wong 2003) and are barely visible, so it is sometimes necessary to use a special staining method (Ucko et al. 1997). During cell locomotion, the theca deforms (Sournia 1986). The theca is contained in relatively few alveoli with a pattern that can be determined (thecal plate tabulation) (Saldarriaga et al. 2004) and used for taxonomic purposes (Parrow et al. 2006).

The cysts are solitary and ovoid in shape (Sournia 1986) and can stay in a dormant/survival stage or start dividing (vegetative cysts) (Bhaud et al. 1991).

Ratledge et al. (2003) reported that the non-motile cysts contain greater levels of lipids, including DHA, than the swimmer form of the microalga.

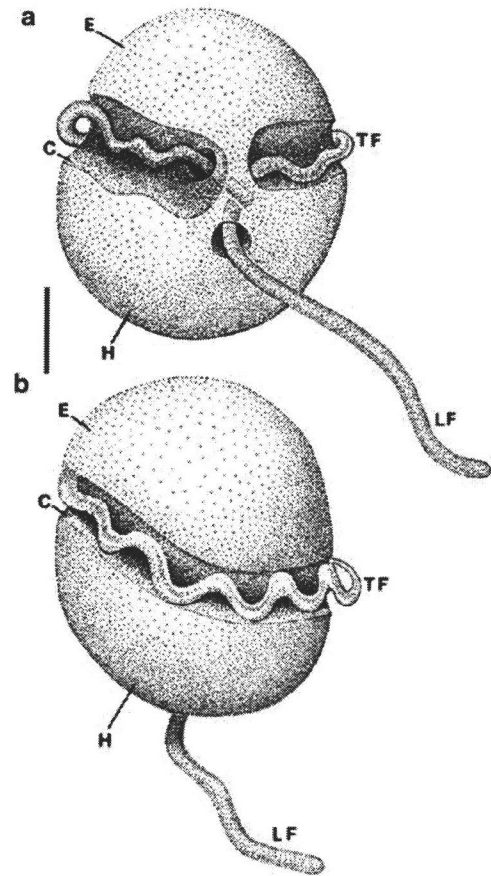


Fig. 1 Schematic representation of *Cryptothecodinium cohnii* cell drawn from Perret et al. (1991). **A** Ventral view. **B** Dorsal view. *E* episome, *H* hyposome, *LF* longitudinal flagellum, *TF* transverse flagellum, *C* cingulum. Bar 5 μm . Reproduced with permission of the Company of Biologists

Reproduction

Cryptothecodinium cohnii has both asexual and the sexual reproduction. It has been reported that the latter is induced by nutrient depletion (Tuttle and Loeblich 1975) and has been observed in dense, rapidly growing cultures (Ucko et al. 1997).

The vegetative cell cycle

Dinoflagellates are unicellular micro-organisms that are eukaryotes with a G1-S-G2-M cell cycle (Bhaud et al. 2000). In a normal cell cycle of the heterotrophic dinoflagellate microalga, motile G1 cells will shed their flagella, encyst and execute the remaining cell-cycle phases [DNA synthesis (S), G2 and mitosis (M)]. The cysts will subsequently produce 2, 4 or 8 daughter cells depending on which cell-cycle pathway the individual cells have taken (Wong and Whiteley 1996). Bhaud et al. (1994) determined the existence and lengthening of the G2-Phase (30 min) in

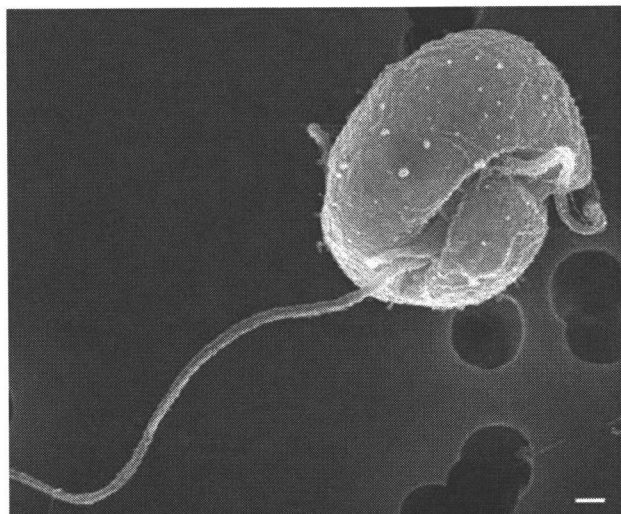


Fig. 2 Scanning electron micrograph of a *Crypthecodinium* species showing the ventral view (from Parrow et al. 2006). Reproduced with permission of the Editor-in-Chief of the Afr. J. Mar. Sci.

the first cycle (cycle with swimming G1 phase) and the time of the second cell cycle phases (cycle in the cyst); G1, 30 min; S, 1.5 h; G2, 2 h and M, 2 h. These results, together with the estimation of the cell volume of the two and four swimming daughter cells emerging from the cysts allowed the authors to state the existence of two transition points: G1/S and G2/M, which are necessary for completion of mitosis (Fig. 3).

When investigating the biochemical or molecular biological events of the cell cycle in relation to the life cycle of the phytoplankton, it is imperative to have a synchronized population of cells. Wong and Whiteley (1996) described a method for synchronizing populations of *C. cohnii* UTEX 1649 using flow cytometric analysis of DNA content to follow the cell cycle progression of synchronized cells.

Kwok and Wong (2005) investigated the dynamics of lipid synthesis in the entire cell cycle of *C. cohnii*. The authors analyzed highly synchronized cells by flow cytometry using Nile Red-stained cells and observed a stepwise increase in polar lipid content and a continuous increase in neutral lipid content in the dinoflagellate cell cycle. They also determined the existence of a commitment point that monitors the synthesis of fatty acids at the late G₁ phase of the cell cycle.

Sexual development

Crypthecodinium cohnii sexual reproduction has isogamy and anisogamy forming a “fertilization bridge” (Bhaud et al. 1988). During fertilization, there is the protoplasmic fusion of gametes and the formation of the planozygote. The zygote encysts, producing the nuclear cyclose in the cyst (Ucko et al. 1997).

Crypthecodinium cohnii meiosis is peculiar as demonstrated by recombination of mobility mutants (Beam and Himes 1974, 1982; Tuttle and Loeblich 1974a, b; Himes and Beam 1975, 1978; Beam et al. 1977). Bhaud et al. (1991) reported either a conventional meiosis with two divisions and no crossing-over or a meiosis with only one division.

Ucko et al. (1997) reported that the gametes form groups of 3–8 cells which move in a lively manner around each other until two cells, anisogametes or isogametes, establish contact with their ventral sides and begin to fuse. The other flagellates swim away, whereas the fused pair does not move away but rotates. Then one of the two transverse flagella is shed, and the developing zygote, with two longitudinal flagella, swims away. Some time later the zygote encysts. The cysts divide and release normally only 2, but sometimes 4–8, dinoflagellates. The new dinoflagellates are motile as soon as they leave the cyst and are thophonts or gametes (Ucko et al. 1997).

***C. cohnii* fatty acid biosynthesis**

Despite the importance of PUFAs, the pathways of formation in *C. cohnii* are still not well known (de Swaaf

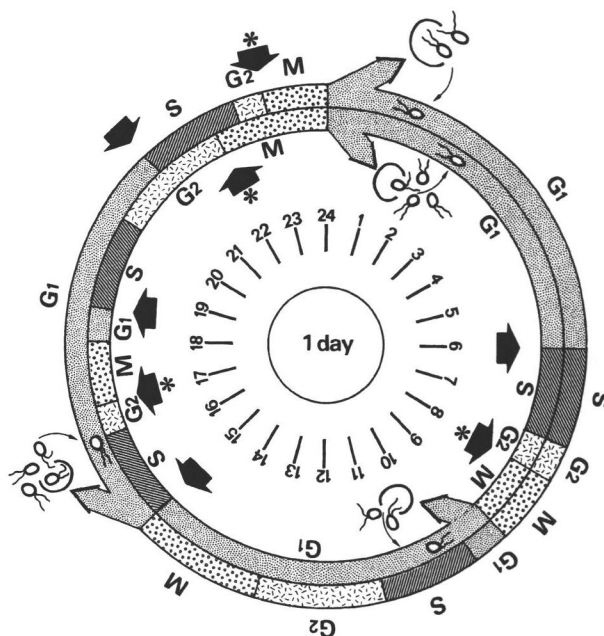


Fig. 3 Diagram of successive cell cycles of a dinoflagellate microalga over 24 h. In this particular example, one vegetative cell performed cell cycles (16 h) and released 4 daughter cells. One of these new swimming cells released 2 daughter cells 10 h later (outer circle of the diagram). During this time, other swimming cells gave an inverse alternation (inner circle). Different diagrams could be possible with other alternations. Transition points G₁/S (“start” point) are presented by arrows and G₂/M by arrows plus star (from Bhaud et al. 1994). Reproduced with permission of Wiley-Blackwell Publisher

et al. 2003a). The absence of chloroplasts offers a system for the study of the synthesis of PUFAs without the involvement of chloroplast glycolipids (Henderson et al. 1988). In fact, this microalga has been used to study the pathways involved in PUFA synthesis by marine microalgae (Beach et al. 1974; Sonnenborn and Kunau 1982; Henderson and Mackinlay 1991). *Cryptocodinium cohnii* can accumulate lipid to over 20% of dry weight with a high content of 22:6 ω -3 [over 30% of total fatty acid (TFA) content]. Other PUFAs remain below 1% of the TFA content (Harrington and Holz 1968; Beach and Holz 1973; de Swaaf et al. 1999). This is remarkable as most marine microalgae rich in PUFAs contain intermediate fatty acids in the cascade of elongation and desaturation, as the saturated fatty acids are successively desaturated and elongated through a series of reactions, using the fatty acid synthetase (FAS) complex of enzymes, leading to the formation of various intermediate PUFAs. Therefore, it has been suggested that the final step leading to *C. cohnii* DHA production is distinct from that found in most microorganisms (Meyer et al. 2003; Ratledge 2004).

So far it has not been clear whether desaturases are involved in *C. cohnii* DHA production (de Swaaf et al. 2003a). In fact, Sonnenborn and Kunau (1982) reported in vitro production of saturated fatty acids, mainly 14:0 and 16:0, by a purified cytosol enzyme complex of *C. cohnii*. They concluded that the FAS system should be operative in *C. cohnii* and might supply the precursors for DHA biosynthesis. However, Beach et al. (1974) incubating *C. cohnii* cells in the presence of ^{14}C -labeled fatty acids ranging from 10 to 18 carbon atoms found that label was detected in oleic acid (18:1 ω 9, the most abundant monounsaturated fatty acid in *C. cohnii*) but not in DHA. In contrast, Henderson and Mackinlay (1991) detected a small amount of label in 22:6 ω -3 when the microalga was grown in the presence of ^{14}C labeled 18:0 or 18:1. De Swaaf et al. (2003a) tested the ability of *C. cohnii* to use ^{13}C -labeled externally supplied precursor molecules for 22:6 biosynthesis by ^{13}C NMR analysis and studied the presence of desaturases (typical for aerobic PUFA synthesis). They suggested that the fatty acid production by *C. cohnii* may be explained by the presence of three tightly regulated separated systems, namely (1) the biosynthesis of saturated fatty acids, (2) the conversion of saturated fatty acids to monounsaturated fatty acids, and (3) de novo synthesis of 22:6 ω -3 with desaturases involved, although it is not clear whether oxygen-dependent desaturases are active in the biosynthesis of DHA in *C. cohnii*. However, the system appears to be aerobic as, in the study of Beach and Holz (1973), the DHA and monounsaturated fatty acids sharply decreased when a growing culture of *C. cohnii* was switched from gassing with air to nitrogen gas.

Ratledge (2004) suggested that DHA biosynthesis in *C. cohnii* could use the PKS route, similar to that found in *Schizochytrium* sp. and probably related thraustochytrid marine protists. In these DHA-synthesising thraustochytrid organisms, the growing fatty acyl chain is not reduced to completely saturated fatty acids as occurs with the “conventional” eukaryotic FAS system, but involves fatty acyl intermediates that remain unsaturated as the chain continues to be lengthened. If this is found to be the case, it would help to explain why it has always been difficult to identify conventional, eukaryotic-like desaturases in *C. cohnii* (Ishiwaka et al., unpublished work referred by Ratledge 2004).

Nutrition

Cryptocodinium cohnii is an obligatory heterotrophic marine dinoflagellate. This implies that it has the capacity for sustained growth and cell division in the dark. Free energy and cell carbon are both obtained from the metabolism of an organic carbon substrate. This and other nutrients are obtained from living or decomposing seaweeds from which they are normally recovered. It has been suggested that *C. cohnii* might have parasitic capabilities in or on macrophytes, as motile cells of all strains appear to have a peduncle, an organelle employed by other dinoflagellates on phagotrophy (Beam and Himes 1987).

Some strains of *C. cohnii* are phagotrophic, like the Elat strain, which preys on cells of the red microalga *Porphyridium* sp. The food uptake of *C. cohnii* Elat strain is a typical myzocytosis, in that the cell content of the prey is ingested by a feeding tube, leaving the prey's cell coat in the medium (Ucko et al. 1997).

Cultivation

Cryptocodinium cohnii has had a long history of laboratory cultivation dating back to early twentieth century (Kyle 1996). *Cryptocodinium cohnii* stands out as a model free-living species complex that can be cultured using both synthetic liquid and solid media (Tuttle and Loeblich 1975; Beam and Himes 1980; Bhaud et al. 1991), likely because of an inherent inclination for resorption related to its natural occurrence amid rotting seaweed (Parrow and Burkholder 2003).

Carbon sources

Originally *C. cohnii* was grown in enriched seawater broths (Tuttle and Loeblich 1975). In a medium containing yeast

extract, sodium acetate and peptone in sea water, *C. cohnii* can readily be propagated in the laboratory (Pringsheim 1956).

Cryptocodinium cohnii strains grow well on organic carbon substrates such as glucose (strain Seligo, Tuttle and Loeblich 1975; strain ATCC 40750, Kyle et al. 1998; strain UTEX L 1649, Vazhappilly and Chen 1998; strains ATCC 30556, ATCC 50051, UTEX L 1649 and RJH, Jiang et al. 1999; strains ATCC 30556, ATCC 50051 and RJH, Jiang and Chen 1999; strain ATCC 30772, de Swaaf et al. 1999; strains UTEX L 1649, CCMP 316 and ATCC 50297, Vazhappilly 1999; strain ATCC 30556, Jiang and Chen 2000a; strain ATCC 30556, Jiang and Chen 2000b; strain ATCC 30772, de Swaaf et al. 2003c), dextrose (strain ATCC 40750, Kyle 1996), ethanol (strain ATCC 30772, de Swaaf et al. 2003b; strain ATCC 30772, Sijtsma and de Swaaf 2004), acetic acid (strain ATCC 30772, Ratledge et al. 2001a; strain ATCC 30772, de Swaaf et al. 2003c; strain ATCC 30772, Sijtsma and de Swaaf 2004), sodium acetate (strain UTEX L1649, Vazhappilly and Chen 1998; strain ATCC 30772, Ratledge et al. 2001a), and carob pulp syrup (strain CCMP 316, Mendes et al. 2007a).

According to some authors, *C. cohnii* grows on glycerol (Beam and Himes 1980). However de Swaaf et al. (1999) reported that no or marginal growth (less than one doubling) was observed when glycerol was offered as a carbon source. *Cryptocodinium cohnii* ATCC 30772 was able to grow on galactose and no or marginal growth was observed on sucrose (de Swaaf et al. 1999). *Cryptocodinium cohnii* was unable to grow on fructose, maltose, rhamnose, arabinose, lactose, galacturonic acid, pectina and aldose (Beam and Himes 1980). Disagreeing with this, the patent by Takeuchi et al. (1994) claims that fructose and galactose can be assimilated by *C. cohnii* ATCC 40750 as carbon sources. According to the patent of the Kawasaki Steel Corporation (Borowitzka 1995), *C. cohnii* can also be incubated in a medium containing fish oil, soybean oil or lactate as a carbon source. However, glucose is the most commonly used substrate for microbial lipid production (Singh and Ward 1996; Sijtsma et al. 2005).

Nitrogen sources and other nutrients

In addition to a reduced carbon source, a nitrogen source must be provided to the culture medium [e.g., peptone, yeast extract (YE), meat extract, glutamic acid, waste molasses, and corn steep liquor, KNO_3 , NH_4Cl] (Borowitzka 1995). Takeuchi et al. (1994) also refer to the use of urea, meat casein hydrolysate and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen sources. With regard to inorganic salts, natural seawater may be the best, but various types of known artificial seawater may also be used, as well as various sodium salts, phosphates, mag-

nesium salts, potassium salts, borates and carbonate salts. Also useful are trace amounts of heavy metals such as iron salts, manganese salts, cobalt salts, zinc salts, chlorine compounds and bromine compounds (Takeuchi et al. 1994; Borowitzka 1995). Therefore, *C. cohnii* can grow in culture media containing inexpensive nutrients, which can be used in industrial bioprocesses.

Growth

Provasoli and Gold (1962) prepared the first synthetic medium to culture *C. cohnii* which was a great improvement over earlier preparations since it eliminated many unnecessary ill-defined components. Later, Tuttle and Loeblich (1975) experimentally defined a synthetic medium, MLH, for optimal growth of this dinoflagellate.

Trying to discover optimal growth conditions for *C. cohnii*, Jiang et al. (1999) tested three previously reported media: Porphyridium medium (Jiang and Chen 1999), A_2E_6 medium (Nerad 1993) and *C. cohnii* medium (Spector 1984), all with glucose as the principal carbon source, and concluded that the *C. cohnii* strains studied show best growth and highest specific grow rate on Porphyridium medium. The authors also investigated the effect of medium glucose concentration on growth over a range of glucose concentrations ($5\text{--}40\text{ g L}^{-1}$) in Porphyridium medium. The highest specific growth rate, highest cell dry weight concentration and highest growth yield on glucose were obtained at 20 g L^{-1} glucose. The lower specific growth rate and cell dry weight observed at higher glucose concentrations were probably due to glucose inhibition (Jiang and Chen 2000a). De Swaaf et al. (1999) also reported glucose inhibition above 25 g L^{-1} in *C. cohnii* shake flask cultures. However, *C. cohnii* was able to grow on a glucose concentration as high as 84.3 g L^{-1} in a 1-L bioreactor (de Swaaf et al. 1999).

With regard to nitrogen and micronutrients sources, de Swaaf et al. (1999) reported an optimum yeast extract concentration of 2 g L^{-1} for growth of *C. Cohnii* in the studied concentration range of $0\text{--}10\text{ g L}^{-1}$.

De Swaaf et al. (2003b) also studied the influence of ethanol concentration on growth of *C. cohnii* shake flask cultures grown on a complex medium containing yeast extract and sea salt. The specific growth rate was optimal with 5 g L^{-1} ethanol and growth did not occur at 0 g L^{-1} and above 15 g L^{-1} , indicating that higher ethanol concentrations inhibited *C. cohnii* growth.

Vazhappilly and Chen (1998) concluded that *C. cohnii* UTEX L1649 showed better heterotrophic shake flask growth on glucose (5 g L^{-1}) than when acetate (1 g L^{-1}) was used as the sole carbon and energy source. However, laboratory-scale, pH controlled, fed-batch cultivations of *C. cohnii* ATCC 30772, a so-called pH auxostat culture with

50% acetic acid as carbon source, showed higher biomass concentration than when glucose was used as the main carbon source (de Swaaf et al. 2003c).

Temperature

The optimum temperature of *C. cohnii* is 27°C (Ishida 1968; Tuttle and Loeblich 1975). Jiang and Chen (2000b) studied the effect of temperature in *C. cohnii* ATCC 30556 and observed that the microalga grew well over the entire range of studied temperatures, 15–30°C. These results are in good agreement with the previously reported cell growth inhibition when the culture temperature was below 14°C or above 31°C (Beach and Holz 1973). Gold and Baren (1966) reported an optimum temperature of 35°C for a *C. cohnii* strain isolated from Puerto Rican water and a growth inhibition at 20°C and 30°C. According to the cultivation process patented by the Martek Corporation (Kyle et al. 1991), cultivation of *C. cohnii* ATCC 40850 can be carried out at any life-sustaining temperature. Generally, *C. cohnii* grows at temperatures ranging from 15 to 34°C. Strains which grow at higher temperatures are preferred for industrial applications (Kyle 2004). For large scale cultivation, a higher cultivation temperature is also desirable, due to an improved cooling capacity at higher temperatures (de Swaaf et al. 1999).

Oxygen supply

As *C. cohnii* is an obligate aerobic organism, cultivation requires an efficient oxygen transfer from gas phase to culture broth. In shake flask cultivation, a reciprocal shaker is sufficient, but in bioreactors an oxygen-efficient supplier is necessary. Growth of *C. cohnii* ATCC 30772 was improved significantly by enhancing the agitation speed from 50 to 100 rpm in shake flask cultivation (OD increased more than four times) (de Swaaf et al. 1999). These results are in good agreement with those reported by Beach and Holz (1973) who reported that the microalgal cells with an enhanced supply of O₂, from shake flask and bioreactor cultures, multiplied more rapidly than cells grown under a restricted supply of oxygen. In *C. cohnii* bioreactor cultivations, oxygen levels should be maintained at a dissolved oxygen level of, at least 10% of air saturation (Kyle et al. 1995, 1998).

Although it has been reported that mechanical agitation has specific growth inhibition effects on dinoflagellates (Berdalet 1992; Berdalet and Estrada 1993; Thomas and Gibson 1990, 1992; Yeung and Wong 2003), relatively high speeds have been successfully used in *C. cohnii* ATCC 30556 shake flask (150 rpm; Jiang and Chen 2000a, b) and in *C. cohnii* ATCC 30772 bench bioreactor cultivations

(1,250 rpm; de Swaaf et al. 2003b, c). De Swaaf et al. (2003c) reported that, in a *C. cohnii* high-cell-density fed-batch cultivation for DHA production, vigorous mixing was required to sustain a sufficient oxygen level during high microalgal cell density cultivation. This was complicated by increasing culture viscosity, which resulted from the production of viscous extracellular polysaccharide. However, the viscosity of the culture supernatant was strongly reduced when a commercial polysaccharide-hydrolyase (Glucanex®) was added to the *C. cohnii* high-cell-density fed-batch culture.

pH

The optimum pH for *C. cohnii* was 6.6 in the range 5.2–7.0 tested (Tuttle and Loeblich 1975). However, the cultivation can be carried out over a broad pH range, typically from about 5.0 to 9.0. Preferably, a pH range from 6.0 to 7.0 is used for the growth phase (Kyle et al. 1991). Jiang and Chen (2000a) studied the effect of initial medium pH (varying from 4 to 10) on growth of *C. cohnii* and obtained the highest specific growth rate, highest cell dry weight concentration and highest growth yield on glucose when the medium pH was 7.2.

Salinity

Jiang and Chen (1999) studied the effect of salinity on cell growth of three marine strains of *C. cohnii* (ATCC 30556, ATCC 50051, RJH) in shake flask cultures and observed that lag phases of the three strains increased with increasing salinity in Porphyridium medium. Optimum NaCl concentration for cell growth is strain specific (Jiang and Chen 1999). According to de Swaaf et al. (1999), for *C. cohnii* ATCC 30772 strain optimal growth, a minimal sea salt concentration of 17.8 g L⁻¹ is required, which is about half the average sea water salinity. The observation of growth inhibition at low salinity is in agreement with previous data. Inhibition of growth at low (<5 g L⁻¹ NaCl) and also high salinity (>50 g L⁻¹ NaCl) has been reported in shake (Beach and Holz 1973) and standing (Tuttle and Loeblich 1975) cultivations of *C. cohnii*. For large-scale cultivation processes, the salt concentration should preferably be as low as possible in order to prevent corrosion problems (de Swaaf et al. 1999). Behrens et al. (2005) patented methods of increasing production of highly unsaturated fatty acids by marine microorganisms, including *C. cohnii*, growing in low chloride media by manipulation of sodium and potassium ion levels. The authors have identified culture conditions that allow *C. cohnii* to be grown in medium with substantially lowered chloride levels without adversely affecting dry weight, fat content or DHA

content when compared to growth in a normal “high chloride” medium, in order to prevent corrosion in stainless steel fermenters.

Light

Tuttle and Loeblich (1975) reported that *C. cohnii* WH-d grows fastest in the dark. The authors observed that cells grown in fluorescent light of $17.9 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ contained 4.5 times more carotenoids than dark-grown cells. The authors suggested that this increase in pigment production could account for the decreased growth rate in the presence of visible light due to increased anabolic energy going to protective pigments rather than to cellular division.

Composition and metabolites

Henderson et al. (1988) reported that lipids accounted for 24.6% of the dry weight of *C. cohnii* WH-d cultured for 6 days to stationary phase in shake flasks containing MLH medium. These lipids were mostly neutral lipid (71.6%, w/w) of which triacylglycerols (TAG) were the major component (76.4%, w/w). Phosphatidylcholine (PC) was the major polar lipid (63.6%, w/w). Phosphatidylethanolamine (PE) was the second most abundant phospholipid although it was present in very much smaller amounts than PC. TAG fatty acids were predominantly saturated, whereas 57% (w/w) of the fatty acids in PC were polyunsaturated. 22:6 ω -3 accounted for over 50% of the fatty acids in PC. Therefore, the DHA in *C. cohnii* WH-d was found to be mostly distributed in PC, the main polar lipid fraction. Beach and Holz (1973) and Jiang and Chen (2000b) supported this observation. On the other hand, Wynn et al. (2005) stated that DHA accumulates predominately in *C. cohnii* cells as TAG, the neutral lipid fraction. In addition, the industrial process patented by the Martek Corporation reported that *C. cohnii* biomass extractable oil comprised more than c. 70% triglycerides having, in general, 30–50% DHA (Kyle 2004). These differences in DHA in the different lipid classes reported by different authors may be due to differences in age culture when the microalgal cells were harvested, cultivation conditions and strains that were used.

Studying the effect of aeration on *C. cohnii* cell fatty acid composition, Beach and Holz (1973) reported that, in fermenter cultures gassed with air, the major neutral lipid fraction, TAG (44% of neutral lipids), contained: 22:6n-3 25%, 18:1n-9 13%, 16:1 1%, 14:1 <1%, 18:0 1%, 16:0 25%, 14:0 28%, and 12:0 10.01%. The major polar lipid fraction, PC (79% of polar lipids), contained 22:6n-3 66%, 22:5n-3 <1% 18:1n-9 2%, 18:0 4%, 16:0 18%, and 14:0 9%. Gassing with N₂ caused a rapid and marked elevation

of 12:0 and 14:0, and to a lesser extent 10:0 and 18:0, and a depression of 18:1n-9, 16:0 and 16:1 and 22:6n-3 in TAG. Variations in temperature and in salinity caused only minor compositional changes in TAG. None of the environmental perturbations significantly changed the fatty acid composition of the PC.

Similar to plant cells, cellulose is the major constituent of the *C. cohnii* cell wall (Kwok and Wong 2005). *Cryptocodinium cohnii* has no photosynthetic pigments but, as a reserve, stores plenty of starch and lipids (Pringsheim 1956; Loeblich 1976). Photosynthesis-associated lipids (mono- and digalctosyldiglycerids, and sulfoquinovosyl diglyceride and their polyunsaturated C₁₈ and C₂₀ fatty acids) are not present. Carotene concentration is higher in light-grown cells than in dark-grown ones (Tuttle et al. 1973), but fatty acid composition is not different (Holz and Beach 1980).

The lipids of *C. cohnii* include isoprenoid types (β -carotene and γ -carotene) (Tuttle et al. 1973) responsible for the yellow-orange color of DHA-rich oil extracted from the alga, 4 α -methyl sterols, dinosterol, dehydrodinosterol (4 α ,23,24-trimethylcholesta-5,22-dien-3 β -ol) and the tentatively identified 4 α ,24-dimethyl-cholestan-3 β -ol and 4 α ,24-dimethylcholest-5-en-3 β -ol. The major 4-demethyl sterol was cholesta-5,7-dien-3 β -ol which was accompanied by a smaller amount of cholesterol and traces of several other C₂₇,C₂₈ and C₂₉ sterols. In addition, a 3-oxo-steroid fraction was isolated and the major component identified as dinosterone (4 α ,23,24-trimethylcholest-22-en-3-one) (Withers et al. 1978).

De Swaaf et al. (2001) characterized extracellular polysaccharides (EPS) produced by *C. cohnii*. The crude EPS contained 55% polysaccharides, 10% proteinaceous components, 10% unknown material (precipitate after hydrolysis), 7% ash and trace amounts of Si, Cl, Fe, Zn and Cu. *C. cohnii* produced multiple EPSs, variable in size and sugar composition. A high molecular mass fraction (from 100 kDa to >1,660 kDa) and a medium molecular mass fraction (6–48 kDa) were detected. The high molecular mass fraction contained (on a molar basis) 71.7% glucose, 13.1% galactose and 3.8% mannose, whereas the medium molecular mass fraction contained 37.7% glucose, 19.8% galactose and 28.1% mannose. Other monomers present in both fractions were fucose, uronic acid and xylose.

DHA production

Cultivation scale and volumetric productivity (r_{DHA}) have been identified as major factors in determining the economic feasibility of fermentative DHA production (Sijtsma

et al. 1998). Factors that determine r_{DHA} are biomass concentration, lipid content of the cells, DHA content of the lipid and cultivation time (de Swaaf et al. 2003c). For economically feasible industrial cultivations of *C. cohnii*, high cell densities are required so it is necessary to optimize the culture medium providing basic data for commercial production of DHA. Growth and fatty acid formation are affected by key medium components and environmental conditions, and a large number of studies have been published, aiming at the DHA production optimization.

Carbon sources

In order to find suitable carbon sources for *C. cohnii* lipid accumulation, different carbon sources were studied by de Swaaf et al. (1999). After 50 h incubation, the lipid content of cells grown on glucose was 13.4% (w/w) whereas cells grown on galactose contained less 11.4% (w/w). The DHA content of the lipids was similar (35.2% with glucose and 36.2% with galactose).

Jiang and Chen (2000a) studied the effect of medium glucose concentration on the DHA content of *C. cohnii*. Although low glucose concentrations enhanced the degree of fatty acid insaturation and DHA formation, this was accompanied by a slow growth rate. Other studies carried out by de Swaaf et al. (2003b, c) investigated the effects of different carbon sources (glucose, acetic acid and ethanol) on *C. cohnii* biomass, lipid, and DHA concentrations. Lipid concentration was found to decrease when cell growth was exponential but, subsequently, increased exponentially when growth was linear owing to an undefined nutrient limitation. Therefore, it appears that lipid production occurs under growth-limiting conditions; during linear growth, the cells are stressed due to nutrient limitation and therefore produce more lipids. It also appears that the quality of the lipid (in % DHA) is affected by growth rate and lipid concentration—the concentration of DHA is negatively affected by increases in lipid concentration. The highest quality lipid (in % DHA) was obtained when glucose was used as the carbon source, and when the cell concentration and lipid content of the cells were the lowest. These results show that optimum growth and maximum DHA accumulation by the microalgae cells require different medium compositions.

De Swaaf et al. (1999) studied the DHA production by *C. cohnii* ATCC 30772, using glucose as the carbon source. In these experiments, the total amounts of lipid and DHA after 91 h attained 3.7 and 1.6 g L⁻¹, respectively (Table 1). However, compared with glucose, the use of acetic acid and ethanol as carbon sources proved to be much more efficient with respect to DHA production (Ratledge et al. 2001a; de Swaaf 2003, b, c; Table 1). Laboratory-scale, pH controlled, fed-batch cultivations of *C. cohnii* ATCC 30772, a so-called pH auxostat culture with 50% acetic acid as the carbon source, achieved lipid and DHA concentrations of 28 and 8 g L⁻¹ respectively, after 210 h (Ratledge et al. 2001a; de Swaaf et al. 2003c). The use of acetic acid/acetate as the carbon source does not require the imposition of a stationary phase in order to obtain satisfactory production of DHA. This is particularly advantageous as it will facilitate adaptation of the method to a continuous or semi-continuous process (Ratledge et al. 2001a).

In comparison with several other *C. cohnii* strains, ATCC 30772 appeared to be the best strain with respect to DHA production using acetate/acetic acid as carbon sources (Ratledge et al. 2001a). The productivity of DHA by this strain was even further increased by the use of pure acetic acid and prolonged cultivation periods (de Swaaf et al. 2003c). This resulted in cultures producing 61 g lipid L⁻¹ and 19 g DHA L⁻¹ after 100 h of cultivation (Table 1). The maximum overall productivities of lipid and DHA were 152 mg L⁻¹ h⁻¹ and 48 mg L⁻¹ h⁻¹, respectively.

A further improvement was achieved by the development of an ethanol fed-batch protocol (de Swaaf et al. 2003b). In a fed-batch cultivation of *C. cohnii* ATCC 30772 with pure ethanol as feed, 83 g dry biomass L⁻¹, 35 g lipid L⁻¹ and 11.7 g DHA L⁻¹ were produced in 220 h. The overall volumetric productivity of DHA in this process was 53 mg L⁻¹ h⁻¹, the highest value ever reported for this alga (Table 1).

Despite the high DHA productivities obtained from these feedstocks, acetic acid in large-scale fermentations requires careful handling, as any spillage or contact with the skin must be dealt with promptly. Moreover, high capital investment and maintenance costs should be considered for fermentation hardware when dealing with a corrosive feedstock such as acetic acid. Ethanol flammability makes

Table 1 DHA productivities of *Cryptocodium cohnii* on different carbon sources (DCW = Dry cell weight)

| Strain | Fermentation time (h) | Carbon source | Cell concentration (g DCW L ⁻¹) | DHA concentration (g L ⁻¹) | DHA productivity (mg L ⁻¹ h ⁻¹) | Reference |
|-----------------------------|-----------------------|------------------|---|--|--|-------------------------|
| <i>C. cohnii</i> ATCC 30772 | 91 | Glucose | 27.7 | 1.4 | 19 | de Swaaf et al. (1999) |
| <i>C. cohnii</i> ATCC 30772 | 400 | Acetic acid | 109.0 | 19.0 | 48 | de Swaaf et al. (2003c) |
| <i>C. cohnii</i> ATCC 30772 | 220 | Ethanol | 83.0 | 11.7 | 53 | de Swaaf et al. (2003b) |
| <i>C. cohnii</i> CCMP 316 | 100 | Carob pulp syrup | 42 | 1.9 | 18.5 | Mendes et al. (2007a) |

this feedstock unsuitable when stored and transported around a production site in its undiluted form. In addition, processes using ethanol may need to be continuously scrutinized by regulatory authorities to prevent the use of the ethanol for purposes other than for which it is intended. This may place unwanted restrictions on its suitability as a large-scale fermentation feedstock (Sijtsma et al. 2005). Therefore, alternative handling carbon sources for *C. cohnii* DHA production should be found. Mendes et al. (2007a) reported a successful *C. cohnii* fed-batch fermentation for DHA production using diluted carob pulp syrup (1:10.5 v/v) supplemented with yeast extract and sea salt attaining 42 g dry biomass L⁻¹ and 1.9 g DHA L⁻¹ after 100 h (Table 1).

Growth phase

The growth phase also influences DHA production. Jiang and Chen (2000b) reported that, as the culture aged up to the early stationary phase, the DHA content increased. The changes in fatty acid composition, such as the DHA content increase and the decrease in saturated fatty acid content in the late exponential phase or early stationary phase, might be the result of complete consumption or starvation of some specific nutrients in the medium that induced qualitative and quantitative changes in fatty acids. Sufficient nutrient supply might lead to the synthesis of more saturated fatty acids. On the contrary, nitrogen limitation might result in the formation of more unsaturated fatty acids (Chen and Johns 1991). Therefore, industrial *C. cohnii* fermentations are usually a carbon-fed batch process and progress in two stages. The first is the active growth phase under nutrient excess conditions, during which the lipid content of the biomass is modest (approximately 20% w/w dry wt). Once the nitrogen source is depleted, carbon is continuously supplied to the fermenter. Since cell growth and division is halted due to the lack of nitrogen for de novo protein and nucleotide synthesis, the supplied carbon is converted into a storage lipid (TAG) rich in DHA (Wynn et al. 2005). During this lipid accumulation phase, *C. cohnii* cells lose their flagella and become “cyst-like” cells packed with DHA-rich lipid bodies. Maintaining the carbon concentration in the cultivation vessel is important to optimize lipid accumulation not only to promote synthesis but also to avoid utilization of the internal storage lipids (Wynn et al. 2005).

Salinity

The effect of salinity on docosahexaenoic acid production by *C. cohnii* was studied by Jiang and Chen (1999) in shake flask cultures. They concluded that, despite the optimum NaCl concentration for DHA production being strain specific, all strains responded to the change of salinity by modifying their cellular fatty acid compositions. The

content of total fatty acids did not show an obvious correlation to salinity, but was decreased when the culture was at a higher salinity. Beach and Holz (1973) also reported that the proportion of DHA decreased when the salinity was above 30 g L⁻¹. De Swaaf et al. (1999) reported that growth and lipid accumulation were stimulated by increasing salinity in the range 2.8–27.8 g L⁻¹ studied.

Temperature

The effects of temperature and temperature shift on the fatty acid composition, DHA content and productivity of *C. cohnii* ATCC 30556 were investigated by Jiang and Chen (2000b). They concluded that higher temperatures (over the range 15–30°C) favored growth with the highest specific growth rate of 0.092 h⁻¹ at 30°C. In contrast, low temperature favored the formation of polyunsaturated fatty acids. In fact, cells grown at low temperatures adapted themselves by increasing the proportion of unsaturated fatty acids, particularly polyunsaturated fatty acids, in order to maintain proper membrane lipid fluidity and functions (Jiang and Chen 2000b). The highest DHA content was obtained at 15°C in the early stationary phase (72 h) (Jiang and Chen 2000b). De Swaaf et al. (1999) also reported that lipid accumulation was clearly influenced by the incubation temperature. When *C. cohnii* ATCC 30772 cells were grown at 27°C for 50 h, the lipid content was 13% compared to 7.8% obtained at 30°C. However, regarding the DHA percentage of lipids, at 27°C it was 35.9%, while at 30°C it attained 40.4%. Beach and Holz (1973) found a higher lipid content in *C. cohnii* cells grown at 31.5°C (11%) than at 25°C (8.7%). These authors, however, harvested the cultures grown at 31.5 and 25°C at different cultivation times (after 4 and 2 days, respectively). This difference in time of harvest may strongly affect the lipid production.

Biocompatible organic solvents

Biocompatible organic solvents have been used in milking microalgae to extract products such as β-carotene from *Dunaliella salina* in two phase bioreactors, leading to higher productivity (Hejazi and Wijffels 2004). A similar process was used for DHA production enhancement from *C. cohnii* (Silva et al. 2006). In this work, two *C. cohnii* carbon-fed batch fermentations were carried out simultaneously in the presence and absence of n-dodecane. It was found that the DHA content of biomass, DHA percentage of TFA and DHA volumetric rate increased 10 and 47%, respectively, compared to the fed-batch fermentation without n-dodecane. It was suggested that the higher amounts of DHA obtained in the n-dodecane presence were produced by substitution of extracted lipids by newly synthesized lipid, enhancing the

overall productivity of the system. The n-dodecane presence also resulted in higher dissolved oxygen tensions and microalgal biomass concentrations, compared to the fermentation with no n-dodecane.

DHA industrial production and patents

Using classical strain screening, many microalgae strains have been isolated that have potentially attractive attributes as DHA producers. Screening for increased lipid production and improved growth under conditions suitable for large-scale production have also been successfully accomplished before scale-up trials by many researchers, as described above.

Successful cultivation of *C. cohnii* to produce commercial edible oil containing DHA has been achieved by Martek Corporation in Maryland, USA. Martek has developed a GMP process utilizing a wild type *C. cohnii* growing on glucose as the main carbon source to produce single cell oil (DHASCO) with a DHA enrichment of greater than 40% (Kyle 1996). Cultures of the organism were grown in liquid medium in shake flasks and transferred to progressively larger vessels. Temperature, pH, air flow, pressure, agitation and dissolved oxygen were all continuously monitored and controlled. When the culture reaches a specific cell density, production of single cell oil was induced by imposition of stationary phase (e.g., by nitrogen depletion or a pH rises) (Kyle et al. 1998). It was the carbon source to nitrogen source ratio which promoted the efficient production of the single cell oil (Kyle et al. 1995, 1998). Using glucose and yeast extract as exemplary, a preferred ratio of carbon source to nitrogen source is about 10–15 parts of glucose to 1 part yeast extract (Kyle et al. 1998).

It is known that, among culturing methods of microorganisms, batch and fed-batch culture are not effective in maintaining a high productivity due to the accumulation of secondary metabolites and waste material which inhibit microbial growth. The Kawasaki Steel Corporation patented a process for producing *C. cohnii* in a high cell density by continuous culturing. The continuous culture was carried out by controlling medium sugar (glucose) at a certain level, preferably from 0.2 to 3.0% w/w. Yeast extract was used as a nitrogen source at from one-fifth to one-tenth of glucose concentration. The dilution rate of the supply medium should be below 0.25 h^{-1} , preferably $0.1\text{--}0.2 \text{ h}^{-1}$, to obtain the maximum productivity (Takeuchi et al. 1994).

In Japan, several heterotrophic processes for producing docosahexaenoic acid by *C. cohnii* have been patented (Borowitzka 1995).

Ratledge et al. (2001b) patented a method in which *C. cohnii* is cultured in a suitable growth medium with

acetic acid/acetate as the main carbon source. The acetate is provided, and replenished, by adding acetic acid to the growth medium in response to an increase in pH resulting from the utilisation of acetic acid/acetate by *C. cohnii*.

Ratledge et al. (2003) also patented a method of culturing *C. cohnii* or microorganisms derived from it in a medium containing propionic acid that is said to cause an increase in the ratio of “cyst” to “swimmer” forms of the microorganism. The non-motile cysts are believed to accumulate greater levels of lipid, including docosahexaenoic acid, than the swimmer form of the organism. Moreover, the cysts do not expend energy in “swimming”.

Final applications

Cryptocodinium cohnii can accumulate a high fraction of DHA with only trivial amounts of other PUFAs, which makes the DHA purification process from this microorganism very attractive, particularly for pharmaceutical applications, since the inclusion of PUFAs as a drug component requires its purification to over 95%. Senanayake and Shahidi (2000) reported a method for DHA concentration from the oil extracted from *C. cohnii* cells with a DHA enrichment from 47.1 to 97.1% with a process yield of 32.5% of the mass of the original algal oil. Mendes et al. (2007b) reported an alternative method of DHA purification from *C. cohnii* wet biomass, where a high DHA fraction (99.2% of TFA) was obtained. Such a process may be an economic alternative method of DHA purification since the extraction step was carried out from wet biomass rather than from lyophilized cells or extracted oil, time-consuming steps that are usually used in the traditional methods of DHA extraction and purification (Grima et al. 1993).

Single cell edible oil containing DHA can be used in infant formulas and baby foods, pharmaceutical products and dietary supplements (in the form of gelatine capsules) (Kyle et al. 1991). The Martek Corporation has patented the blending of its DHA from *C. cohnii* and sells it primarily for use in infant formulas. The company has entered into license agreements with 15 infant formula manufacturers which represent more than 70% of the world's wholesale infant formula market, including Mead Johnson Nutritionals (Bristol-Myers Squibb) among others. Formulas containing Martek's DHA oil are now available in more than 60 countries worldwide, including the United States, United Kingdom, Mexico, China, and Canada.

The residual biomass (i.e. cell carcasses that remain after fatty acids have been extracted from lysed cells) can be used as an animal feed, containing as it does about 35–40% protein, 8–10% ash and 45–50% carbohydrates (Kyle et al. 1991, 1998). Because of this high protein content and the elevated levels of DHA, the whole biomass paste can be

used for aquaculture (e.g., shrimp, oysters, fish) feed (Kyle et al. 1991).

Heterotrophically grown algae and their residual materials from an industrial oil extraction process were used as components in marine larval and broodstock diets. *Cryptocodinium* sp. phospholipid extract and meal, used to enrich rotifers and *Artemia* nauplii, produced higher levels of DHA and higher DHA/EPA ratios in these zooplankters. In addition, a 60% replacement of menhaden oil with algal oil and meal in striped bass broodstock diets resulted in a similar growth increase to that obtained with standard commercial diets. These findings demonstrate the potential of single cell heterotrophs as a partial substitute or replacement for fish-based ingredients in aquaculture diets (Harel et al. 2002). Fish and shrimp farming is rapidly growing, and DHA is an essential fatty acid for the growth of juvenile fish. The introduction of DHA from microalgae rather than from fish meal and oil, results in an additional benefit as microalgae are a completely renewable and contaminant-free resource.

The residual microalgal biomass can also be mixed with a combination of brewer's yeast, a grain product such as whole wheat, and burnt residues that collect on the interior walls of drying vessels used for spray-drying of yeast extracts. These ingredients are mixed with water to form a dough-like substance, which is made into a desired shape for dog, cat, or other pet treats. The dough is then cooked to form a pleasant-smelling biscuit-type treat which dogs and cats find highly appealing. Algal biomass can also be incorporated into "flavor or palatability enhancer" additives that are coated into surfaces of pelleted or extruded chunks, to prepare a flavored dog or cat food. Using algal or fungal biomass in the manner eliminates a noxious and foul-smelling waste problem for manufacturers of nutrition supplements. In addition, pet foods created in this manner contain quantities of DHA, a nutrient that is highly valuable in food for dogs and cats (Criggall et al. 2002). This invention relates to foods for mammalian companion animals, including cats, dogs, ferrets, and pot-bellied pigs. Although it may be also useful for livestock, poultry, or other farm animals, or for aquaculture (Criggall et al. 2002; Calado et al. in press).

As *C. cohnii* is non-photosynthetic it is potentially useful as a biochemical tool for the characterization of the enzymes involved in the production of 22:6 ω -3 without the complication of the substrate transfer between chloroplast and non-chloroplast lipids. *C. cohnii* possesses all the enzymes necessary for de novo synthesis of 22:6 ω -3 and is therefore an ideal candidate for use in studies on the pathways and enzymology of fatty acid desaturation and elongation (Henderson and Mackinlay 1991).

Microalgal bioprocesses for ω -3 PUFAs production, namely DHA, has been considered of economic interest.

Cryptocodinium cohnii is a valuable source for DHA production, and several aspects of the process can be further improved, including strain selection, medium composition, carbon-source feeding strategy and control. Genetic engineering of this microorganism may potentially lead to even higher productivity at lower costs.

Acknowledgements The authors wish to express their gratitude to the following publishers and institutions for permission to use material in this review: The company of Biologists, for the use of Figure 1; The Editor-in-Chief of the Afr. J. Mar. Sci., for the use of Figure 2; Wiley-Blackwell Publisher, for the use of Figure 3.

References

- Beach DH, Holz GG (1973) Environmental influences on the docosahexaenoate content of the triacylglycerols and phosphatidylcholine of a heterotrophic, marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. *Biochim Biophys Acta* 316:56–65
- Beach DH, Harrington GW, Gellerman JL, Schlenk H, Holz GG (1974) Biosynthesis of oleic acid and docosahexaenoic acid by a heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Biochim Biophys Acta* 369:16–24
- Beam CA, Himes M (1974) Evidence for sexual fusion and recombination in the dinoflagellate *Cryptocodinium* (*Gyrodinium*) *cohnii*. *Nature* 250:435–436 doi:10.1038/250435a0
- Beam CA, Himes M (1977) Sexual isolation and genetic diversification among some strains of *Cryptocodinium cohnii*-like dinoflagellates. Evidence of speciation. *J Protozool* 24:532–539
- Beam CA, Himes M (1980) Utilization of carbon sources by different strains of *Cryptocodinium cohnii* Seligo. *J Protozool* 27:A37
- Beam CA, Himes M (1982) Distribution of members of the *Cryptocodinium cohnii* (Dinophyceae) species complex. *J Protozool* 29:8–15
- Beam CA, Himes M (1987) Electrophoretic characterization of members of the *Cryptocodinium cohnii* (Dinophyceae) species complex. *J Protozool* 34:204–217
- Beam CA, Himes M, Himelfarb J, Link C, Shaw K (1977) Genetic evidence of unusual meiosis in dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Genetics* 87:19–32
- Beam CA, Preparata RM, Himes M, Nanney DL (1993) Ribosomal RNA sequencing of members of the *Cryptocodinium cohnii* (Dinophyceae) species complex; comparison with soluble enzyme studies. *J Eukaryot Microbiol* 40:660–667 doi:10.1111/j.1550-7408.1993.tb06124.x
- Berdalet E (1992) Effects of turbulence on the marine dinoflagellate *Gymnodinium nelsonii*. *J Phycol* 28:267–272 doi:10.1111/j.0022-3646.1992.00267.x
- Berdalet E, Estrada M (1993) Effects of turbulence on several dinoflagellate species. *Dev Mar Biol* 3:737–740
- Behrens PW, Thompson JM, Apt K, Pfeifer JW, Wynn JP, Lippmeier JC et al (2005) Production of high levels of DHA in microalgae using modified amounts of chloride and potassium. WO Patent 035775 A1
- Bhaud Y, Soyer-Gobillard MO, Salmon JM (1988) Transmission of gametic nuclei through a fertilization tube during mating in a primitive dinoflagellate. *Prorocentrum micans* Ehr. *J Cell Sci* 89:197–206
- Bhaud Y, Salmon JM, Soyer-Gobillard MO (1991) The complex cell cycle of the dinoflagellate protist *Cryptocodinium cohnii* as studied *in vivo* and by cytofluorimetry. *J Cell Sci* 100:675–682

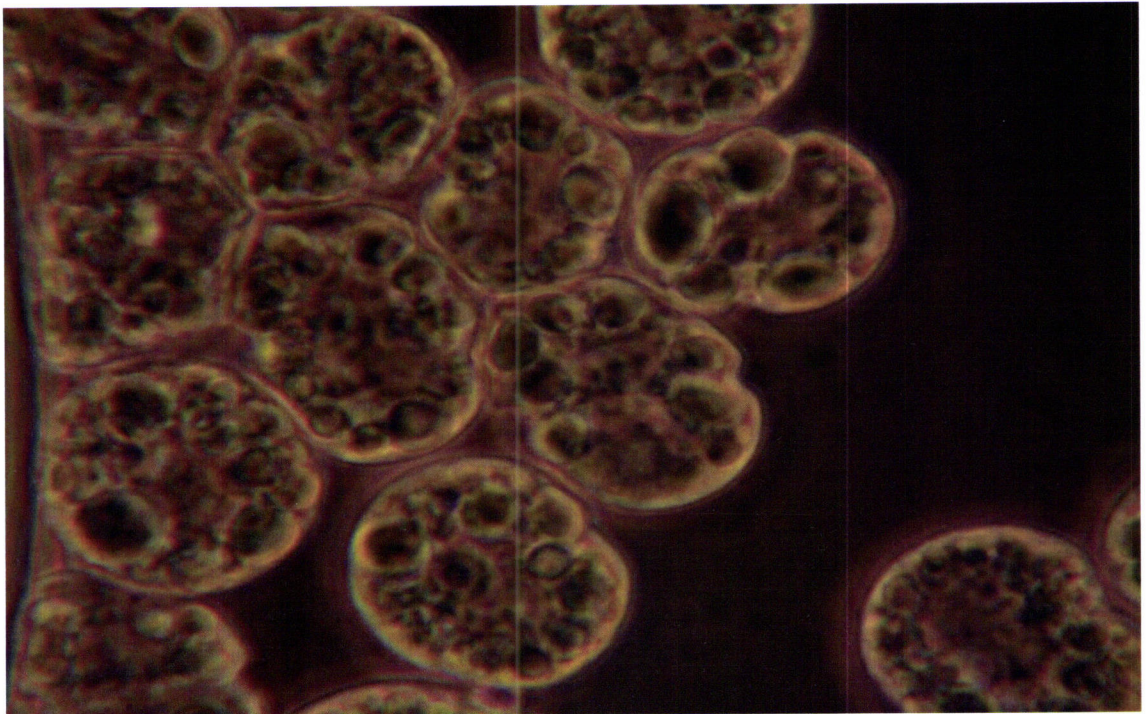
- Bhaud Y, Barbier M, Soyer-Gobillard MO (1994) A detailed study of complex cell cycle of the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Biecheler and evidence for variation in histone H1 kinase activity. *J Eukaryot Microbiol* 41:519–526 doi:10.1111/j.1550-7408.1994.tb06052.x
- Bhaud Y, Guillebault D, Lennon JF, Defacque H, Soyer-Gobillard MO, Moreau H (2000) Morphology and behaviour of dinoflagellates chromosomes during the cell cycle and mitosis. *J Cell Sci* 113:1231–1239
- Biecheler B (1952) Recherches sur les Péridiniens. *Bull Biol Fr Belg* 36:S1–S149
- Bourre JM (2005) Where to find ω -3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in ω -3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: What is actually useful? *J Nutr Health Aging* 9:232–242
- Borowitzka MA (1995) Patents. *J Appl Phycol* 7(5):509–520 doi:10.1007/BF00003937
- Boswell K, Koskelo EK, Carl L, Glaza S, Hensen DJ, Williams KD et al (1996) Preclinical evaluation of single cell oils that are highly enriched with arachidonic acid. *Food Chem Toxicol* 34:585–593 doi:10.1016/0278-6915(96)00019-1
- Carroll KK (1986) Experimental studies on dietary fat and cancer in relation to epidemiological data. In: Ip C, Birt DF, Rogers AE, Mettlin C (eds) Dietary fat and cancer - progress in chemical and biological research. Alan RL, New York, pp 231–248
- Calado R, Vitorino A, Reis A, Silva TL, Dinis MT (in press) Effect of different diets on larval production, quality and fatty acid profile of the marine ornamental shrimp *Lysmata amboinensis* (De Man, 1888). *Aquacult Nutr*
- Carlson SE, Wilson WW (1994) Docosahexaenoic Acid (DHA) supplementation of preterm (Pt) infants - effect on the 12-month bayley mental developmental index (MDI). *Pediatr Res* 35:A20
- Chatton P (1952) Classe des Diniflagellates ou Péridiniens. In: Grassé PP (ed) *Traité de Zoologie*, vol 1, part 1. Masson, Paris, pp 309–406
- Chen F, Johns MR (1991) Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *J Appl Phycol* 3:203–209 doi:10.1007/BF00003578
- Christensen JH, Skou HA, Madsen T, Topping I, Schmidt EB (2001) Heart rate variability and ω -3 polyunsaturated fatty acids in patients with diabetes mellitus. *J Intern Med* 249:545–552 doi:10.1046/j.1365-2796.2001.00841.x
- Connor WE (2000) Importance of ω -3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 71(Suppl.):171S–175S
- Crawford MA (1993) The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition. *Am J Clin Nutr* 57(Suppl.):703S–710S
- Crawford MA, Costeloe K, Ghebremeskel K, Phlactos A, Skirvin L, Stacey F (1997) Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of pre-term babies? *Am J Clin Nutr* 66:1032S–1041S
- Criggall JG, Trivedi NB, Hutton JR (2002) Pet foods using algal or fungal waste containing fatty acids. US Patent 6338866
- Das UN, Fams MD (2003) Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory. *Nutrition* 19:62–65 doi:10.1016/S0899-9007(02)00852-3
- de Swaaf ME (2003) Docosahexaenoic acid production by the marine alga *Cryptocodinium cohnii*. Doctoral thesis, Delft University, Delft University Press, The Netherlands
- de Swaaf ME, Rijk TC, Eggink G, Sijtsma L (1999) Optimization of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *J Biotechnol* 70:185–192 doi:10.1016/S0168-1656(99)00071-1
- de Swaaf ME, Grobden GJ, Eggink G, Rijk TC, Meer P, Sijtsma L (2001) Characterisation of extracellular polysaccharides produced by *Cryptocodinium cohnii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:395–400 doi:10.1007/s002530100788
- de Swaaf ME, de Rijk TC, van der Meer P, Eggink G, Sijtsma L (2003a) Analysis of docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by ^{13}C labelling and desaturase inhibitor experiments. *J Biotechnol* 103:21–29 doi:10.1016/S0168-1656(03)00070-1
- de Swaaf ME, Pronk JT, Sijtsma L (2003b) Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:40–43
- de Swaaf ME, Sijtsma L, Pronk JT (2003c) High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*. *Biotechnol Bioeng* 81:666–672 doi:10.1002/bit.10513
- Edwards RH, Peet M (1999) Essential fatty acid intake in relation to depression. In: Peet M, Glenn I, Horrobin DF (eds) *Phospholipid spectrum disorder in psychiatry*. Marius Press, Lancashire, p 211
- Fensome RA, Taylor FJR, Norris G, Sarjeant WAS, Wharton DI, Williams GL (1993) A classification of fossil and living dinoflagellates. *Micropaleontology Press Spec Pap* 7:1–351
- Gold K, Baren CF (1966) Growth requirements of *Gyrodinium cohnii*. *J Protozool* 13:255–257
- Grima EM, Perez JAS, Camacho FG, Sánchez JL, Alonso DL (1993) ω -3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:599–605 doi:10.1007/BF00182796
- Hackett JD, Anderson DM, Erdner DL, Bhattacharya D (2004) Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *Am J Bot* 91(10):1523–1534 doi:10.3732/ajb.91.10.1523
- Harel M, Koven W, Lein I, Bar Y, Behrens P, Stubblefield J et al (2002) Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture* 213:347–362 doi:10.1016/S0044-8486(02)00047-9
- Harrington GW, Holz GG (1968) The monoenoic docosahexaenoic fatty acids of a heterotrophic dinoflagellate. *Biochim Biophys Acta* 164:137–139
- Henderson RJ, Mackinlay EE (1991) Polyunsaturated fatty acid metabolism in the marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phytochemistry* 30(6):1781–1787 doi:10.1016/0031-9422(91)85012-O
- Henderson RJ, Leftley JW, Sargent JR (1988) Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phytochemistry* 27:1679–1683 doi:10.1016/0031-9422(88)80425-4
- Hejazi MA, Wijffels RH (2004) Milking of microalgae. *Trends Biotechnol* 22:189–194 doi:10.1016/j.tibtech.2004.02.009
- Hibbeln JR, Salem JN (1995) Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy. *Am J Clin Nutr* 62:1–9
- Himes M, Beam CA (1975) Genetic analysis in dinoflagellate *Cryptocodinium (Gyrodinium) cohnii*: evidence for unusual meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:4546–4549 doi:10.1073/pnas.72.11.4546
- Himes M, Beam CA (1978) Further studies of breeding restrictions among *Cryptocodinium cohnii*-like dinoflagellates. Evidence of a new interbreeding group. *J Protozool* 25:378–380
- Holz GG, Beach DH (1980) Lipids of *Cryptocodinium cohnii*. *J Protozool* 27:A37–A37
- Ishida Y (1968) Physiological studies on evolution of dimethyl sulphide from unicellular marine alga. *Meml Res Inst Sci Kyoto Univ* 94:48–82
- Jiang Y, Chen F (1999) Effects of salinity on cell growth and docosahexaenoic acid content of the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:508–513 doi:10.1038/sj.jim.2900759

- Jiang Y, Chen F (2000a) Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochem* 35:1205–1209 doi:10.1016/S0032-9592(00)00163-1
- Jiang Y, Chen F (2000b) Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. *J Am Chem Soc* 77:613–617 doi:10.1007/s11746-000-0099-0
- Jiang Y, Chen F, Liang SZ (1999) Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochem* 34:633–637 doi:10.1016/S0032-9592(98)00134-4
- Joordens JCA, Kuipers RS, Muskiet FAJ (2007) Preformed dietary DHA: The answer to a scientific question may in practice become translated to its opposite. *Am J Hum Biol* 19:582–584 doi:10.1002/ajhb.20675
- Kofoid CA, Swezy O (1921) The free living unamored Dinoflagellata. *Mem University Calif* 5:1–562
- Kubai DF, Ris H (1969) Division in the dinoflagellate *Gyrodinium cohnii* (Schiller). A new type of nuclear reproduction. *J Cell Biol* 40:508–528 doi:10.1083/jcb.40.2.508
- Kyle DJ (1996) Production and use of a single cell oil which is highly enriched in docosahexaenoic acid. *Lipid Technol* 8:107–110
- Kyle DJ (2004) Use of docosahexaenoic acid for the manufacture of a medicament for the treatment of senile dementia and Alzheimer's disease. Martek Bioscience Corporation. E Patent 1419780 A1
- Kyle DJ, Reeb SE, Sicotte VJ (1991) Docosahexaenoic acid, methods for its production and compounds containing the same. Martek Corporation, WO Patent 9111918
- Kyle DJ, Reeb SE, Sicotte VJ (1995) Production of Docosahexaenoic acid by dinoflagellates. Martek Corporation, Martek Corporation, US Patent 5407957
- Kyle DJ, Reeb SE, Sicotte VJ (1998) Dinoflagellate biomass, methods for its production, and compositions containing the same. Martek Bioscience Corporation, US Patent 5711983
- Kwok ACM, Wong JTY (2003) Cellulose synthesis is coupled to cell cycle progression at G1 in the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Plant Physiol* 131:1681–1691 doi:10.1104/pp.102.018945
- Kwok ACM, Wong JTY (2005) Lipid biosynthesis and its coordination with cell cycle progression. *Plant Cell Physiol* 46(12):1973–1986 doi:10.1093/pcp/pci213
- Li D, Bode O, Drummond H, Sinclair AJ (2003) ω -3 fatty acids. In: Gunstone FD (ed) *Lipids for functional foods and nutraceuticals*. The Oily Press, New York, pp 225–262
- Liu G, Bibus DM, Bode AM, Ma WY, Holman RT, Dong Z (2001) ω -3 but not polyunsaturated fat content of canned meats commonly available in Australia. *Food Aust* 54:311–315
- Loeblich AR (1976) Dinoflagellate evolution: speculation and evidence. *J Protozool* 23:13–28
- Mendes A, Guerra P, Madeira V, Ruano F, Silva TL, Reis A (2007a) Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1209–1215
- Mendes A, Silva TL, Reis A (2007b) DHA concentration and purification from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by winterization and urea complexation. *Food Technol Biotechnol* 45:38–44
- Medina A, Giménez A, Camacho F, Pérez J, Grima A, Gómez A (1995) Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana*. *J Am Oil Chem Soc* 72:575–583
- Meyer A, Cirpus P, Ott C, Schlecker R, Zahringer U, Heinz E (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: Biochemical and molecular evidence for the involvement of a delta 4-fatty acyl group desaturase. *Biochemistry* 42:9779–9788 doi:10.1021/bi034731y
- Moreau H, Géraud ML, Bhaud Y, Soyer-Gobillard MO (1998) Cloning, characterization and chromosomal localization of a repeated sequence in *Cryptocodinium cohnii*, a marine dinoflagellate. *Int Microbiol* 1:35–43
- Narayan B, Miyashita K, Hosakawa M (2006) Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) - A review. *Food Rev Int* 22:291–307 doi:10.1080/87559120600694622
- Nerad TA (1993) American type culture collection, catalogue of protists, 18th edn. Rockville, USA
- Nettleton JA (1992) Are ω -3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? *J Am Diet Assoc* 93:58–64 doi:10.1016/0002-8223(93)92132-H
- Parrow MW, Burkholder JM (2003) Estuarine heterotrophic *Cryptoperidiniopsis* (dinophyceae): life cycle and culture studies. *J Phycol* 39:678–696 doi:10.1046/j.1529-8817.2003.02146.x
- Parrow MW, Elbrächter M, Krausse MK, Burkholder JM, Deamer NJ, Htye N et al (2006) The taxonomy and growth of a *Cryptocodinium* species (Dinophyceae) isolated from a brackish-water fish aquarium. *Afr J Mar Sci* 28(2):185–192
- Perret E, Alberta M, Bordes N, Bormens M, Soyer-Gobillard MO (1991) Microtubular spindle and centrosome structures during the cell cycle in a dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* B - an immunocytochemical study. *Biosystems* 25:53–65 doi:10.1016/0303-2647(91)90012-A
- Perret E, Davout J, Albert M, Besseau L, Soyer-Gobillard MO (1993) Microtubule organization during the cell cycle of the primitive eukaryote dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *J Cell Sci* 104:639–651
- Pringsheim EG (1956) Micro-organisms from decaying seaweed. *Nature* 178:480–481 doi:10.1038/178480a0
- Provasoli L, Gold K (1962) Nutrition of American strains of *Gyrodinium cohnii*. *Arch Mikrobiol* 42:196 doi:10.1007/BF00408175
- Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86:807–815 doi:10.1016/j.biochi.2004.09.017
- Ratledge C (2005) Single Cell Oils for the 21st Century. In: Cohen Z, Ratledge C (eds) *Single cell oils*. AOCS Press, Illinois, pp 1–20
- Ratledge C, Kanagachandran K, Anderson AJ, Grantham DJ, Stephenson JC (2001a) Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *Lipids* 36:1241–1246 doi:10.1007/s11745-001-0838-x
- Ratledge C, Anderson AJ, Kanagachandran K, Grantham D, Stephenson JC, de Swaaf M et al (2001b) Culture of *Cryptocodinium cohnii* for the synthesis of a polyunsaturated fatty acid. WO Patent 2001004338
- Ratledge C, Anderson AJ, Kanagachandran K (2003) Method of culturing of *Cryptocodinium cohnii*. GB Patent 103301
- Raes K, de Smet S, Demeyer D (2004) Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Anim Feed Sci Technol* 113:199–221 doi:10.1016/j.anifeedsci.2003.09.001
- Ruxton CHS, Calder PC, Reed SC, Simpson MJA (2005) The impact of long-chain ω -3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutr Res Rev* 18:113–129 doi:10.1079/NRR200497
- Saldarriaga JF, Taylor FJR, Cavalier-Smith T, Menden-Deuer S, Keeling PJ (2004) Molecular data and the evolutionary history

- of dinoflagellates. *Eur J Protistol* 40:85–111 doi:10.1016/j.ejop.2003.11.003
- SanGiovanni JP, Berkeley CS, Dwyer JT, Colditz GA (2000) Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review. *Early Hum Dev* 57:165–188 doi:10.1016/S0378-3782(00)00050-5
- Schiller J (1933) Dinoflagellatae (Peridineae) in monographischer Behandlung. In: Kolkwitz R (ed) Rabenhorst's Kryptogamenflora 10(3), 2nd edn. Akad Verlag, Leipzig
- Seligo A (1885) Untersuchungen über Flagellaten. *Beitraege Biol Pflanzen* 4:145–180
- Senanayake SP, Shahidi F (2000) Concentration of Docosahexaenoic Acid (DHA) from algal oil via urea complexation. *J Food Lipids* 7:51–61 doi:10.1111/j.1745-4522.2000.tb00160.x
- Sijtsma L, de Swaaf ME (2004) Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:146–153 doi:10.1007/s00253-003-1525-y
- Sijtsma L, Springer J, Meesters PA, de Swaaf ME, Enggink G (1998) Recent advances in fatty acid synthesis in oleaginous yeasts and microalgae. *Recent Res Dev Microbiol* 2:219–232
- Sijtsma L, Anderson A, Ratledge C (2005) Alternative carbon sources for heterotrophic production of docosahexaenoic acid by the marine alga *Crypthecodinium cohnii*. In: Cohen Z, Ratledge C (eds) Single cell oils. AOCS Press, Illinois, pp 107–123
- Silva TL, Mendes A, Mendes R, Calado V, Alves SS, Vasconcelos JMT et al (2006) Effect of n-dodecane on *Crypthecodinium cohnii* fermentations and DHA production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:408–416 doi:10.1007/s10295-006-0081-8
- Singh A, Ward OP (1996) Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseau* ATCC 28210. *J Ind Microbiol Biotechnol* 16:370–373
- Sonnenborn U, Kunau WH (1982) Purification and properties of the fatty acid synthetase complex from the marine dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. *Biochim Biophys Acta* 712:523–534
- Sournia A (1986) Atlas du phytoplancton marin. Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidophycées (vol. 1). Edition du CNRS, Paris
- Spector DL (1984) Dinoflagellate. Academic Press, New York
- Takeuchi D, Uehara K, Lizuka T (1994) Processes for culturing marine microalgae and producing docosahexaenoic acid using the same. EP Patent 0622463
- Thomas WH, Gibson CH (1990) Effects of small-scale turbulence on microalgae. *J Appl Phycol* 2:71–77 doi:10.1007/BF02179771
- Thomas WH, Gibson CH (1992) Effects of quantified small-scale turbulence on the dinoflagellate, *Gymnodinium sanguineum* (splendens): contrasts with *Gonyaulax (Lingulodinium) polyedra*, and the fishery implication. *Deep-Sea Res* 39:1429–1437 doi:10.1016/0198-0149(92)90078-8
- Tuttle RC, Loeblich AR, Smith VE (1973) Carotenoids of *Crypthecodinium cohnii*. *J Protozool* 20:521–521
- Tuttle RC, Loeblich AR (1974a) The discovery of genetic recombination in dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. *J Phycol* 10:16S
- Tuttle RC, Loeblich AR (1974b) Genetic recombination in dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. *Science* 185:1061–1062 doi:10.1126/science.185.4156.1061
- Tuttle RC, Loeblich AR (1975) An optimal growth medium for the Dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. *Phycologia* 14:1–8
- Ucko M, Cohen S, Gordin H, Arad S (1989) Relationship between the unicellular red microalga *Porphyridium* sp. and its predator, the dinoflagellate *Gymnodinium* sp. *Appl Environ Microbiol* 53:2990–2884
- Ucko M, Elbrächter M, Schnepf E (1997) A *Crypthecodinium cohnii*-like dinoflagellate feeding myzocytotically on the unicellular red alga *Porphyridium* sp. *Eur J Phycol* 32:133–140
- Van Beelen VA, Roelleveld J, Mooibroek H, Sijtsma L, Bino RJ, Bosch D et al (2007) A comparative study on the effect of algal and fish oil on viability and cell proliferation of Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 45:716–724 doi:10.1016/j.fct.2006.10.017
- Van Pelt CKV, Huang MC, Tschanz CL, Brenna JT (1999) An octaene fatty acid, 4,7,10,13,16,19,22,25-Octacosaoctaenoic acid (28:8n-3), found in marine oils. *J Lipid Res* 40:1501–1505
- Vazhappilly R (1999) Effects of environmental factors and desaturase inhibitors on formation of docosahexaenoic acid by *Crypthecodinium cohnii* strains under heterotrophic growth conditions. Doctoral thesis, University of Hong-Kong
- Vazhappilly R, Chen F (1998) Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production Potential of microalgae and their heterotrophic growth. *J Am Oil Chem Soc* 75:393–397
- Withers NW, Tuttle RC, Holz GG, Beach DH, Goad LJ, Goodwin TW (1978) Dehydrodinosterol, dinosterone and related sterols of a non-photosynthetic dinoflagellate, *Crypthecodinium cohnii*. *Phytochemistry* 17:1987–1989 doi:10.1016/S0031-9422(00)88748-8
- Wong JTY, Whiteley A (1996) An improved method of cell synchronisation for the heterotrophic dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii* Biecheler analysed by flow cytometry. *J Exp Mar Biol Ecol* 197:91–99 doi:10.1016/0022-0981(95)00146-8
- Wynn J, Behrens P, Sundararajan A, Hansen J, Apt K (2005) Production of single cell oils by dinoflagellates. In: Cohen Z, Ratledge C (eds) Single cell oils. AOCS press, Illinois, pp 86–98
- Yeung PKK, Wong JTY (2003) Inhibition of cell proliferation by mechanical agitation involves transient cell cycle arrest at G₁ phase in dinoflagellates. *Protoplasma* 220:173–178 doi:10.1007/s00709-002-0039-2

CAPÍTULO 7

Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro



Crypthecodinium conhii (Seligo) CCMP 316. Ampliação ($\times 1000$)

Capítulo 7 – Conclusões e sugestões para trabalho futuro

Conclusões

A temperatura óptima para crescimento de *Cryptocodinium cohnii* e produção de DHA foi 27 °C (Anexo 2).

C. cohnii CCMP 316 foi capaz de crescer em glucose, glicerol e xarope de alfarroba. O crescimento em glicerol foi lento e pouco atractivo quer em termos de produtividade em biomassa quer em termos de produção de DHA. Não se observou crescimento utilizando frutose como fonte de carbono.

Em meios de cultura de baixo custo, contendo xarope de alfarroba diluído como fonte de carbono, a microalga *Cryptocodinium cohnii* atingiu produtividades em biomassa e em DHA (418 mg/Lh e 18,5 mg/Lh, respectivamente) superiores às descritas para os meios convencionais contendo glucose como fonte de carbono (216 mg/Lh e 14,0 mg/Lh, respectivamente). O processo de extracção do xarope de alfarroba, fácil e pouco dispendioso, aliado à facilidade de manipulação e aos benefícios ambientais que advêm do facto de se utilizar um sub-produto na produção de DHA (produto de elevado valor acrescentado) fazem com que constitua uma matéria-prima promissora para a produção de DHA em grande escala por *C. cohnii*.

Verificou-se que a adição de 1% (v/v) de *n*-dodecano ao meio de cultura de *C. cohnii*, permitia aumentar a produtividade em biomassa, a taxa específica de crescimento, a concentração e a produtividade em DHA das fermentações em *fed-batch* comparativamente às fermentações em que, nas mesmas condições, não era utilizado este vector de oxigénio. Os resultados apontam para que a utilização deste solvente (em baixas concentrações) possa resolver a limitação em oxigénio das culturas de elevadas densidades celulares desta microalga em fermentadores à escala industrial, obviando o recurso a taxas de agitação elevadas cuja utilização aumenta os custos do processo e é prejudicial em culturas de microrganismos sensíveis à tensão de corte.

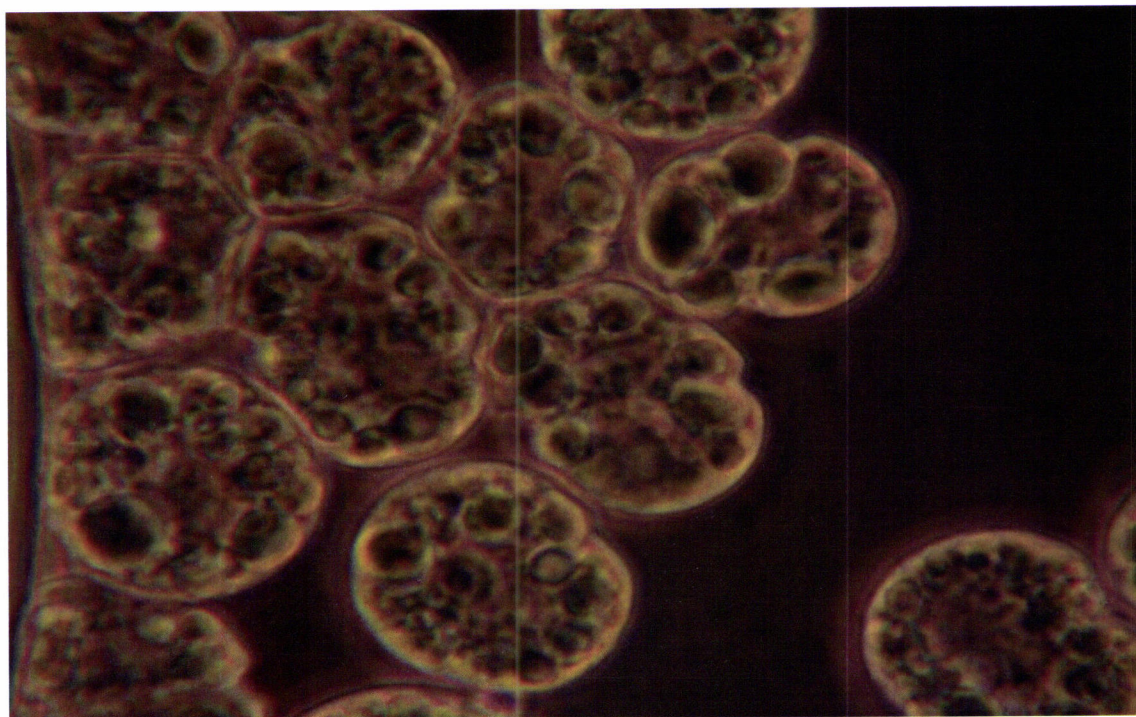
Foi desenvolvido um procedimento simples e pouco dispendioso para purificar e concentrar o DHA extraído da biomassa de *C. cohnii* CCMP 316. O referido procedimento envolve a saponificação e metilação da biomassa húmida, seguidas de winterização e complexação com ureia, de forma sequencial, do óleo obtido. O processo permitiu obter DHA com uma pureza de 99,2% (do total de ácidos gordos) na fracção não complexada com a ureia. Atendendo a que o valor obtido na fracção purificada é

muito superior aos 95% requeridos para aplicações farmacêuticas, o processo foi considerado adequado à purificação do DHA a partir de *C.cohnii* para fins farmacêuticos.

Sugestões para trabalho futuro

- Testar o xarope de alfarroba no crescimento e produção de DHA por *Schizochytrium* sp., microrganismo que produz DHA e que tem a vantagem de metabolizar glucose e frutose como fonte de carbono.
- Testar o crescimento e produção de DHA por *C. cohnii*, utilizando glicerina (sub-produto) em vez de glicerol puro.
- O *screening* de microrganismos produtores de DHA até à data desconhecidos.
- Possibilidade de modificar geneticamente alguns bons produtores de lípidos microbianos (e.g. *Cryptococcus curvatus*) que, presentemente, não produzem PUFAs de interesse de maneira a que passem a produzi-los.
- Possibilidade de modificar geneticamente plantas de sementes oleaginosas. Esta hipótese é atractiva devido à elevada produtividade das culturas e ao facto de estarem bem estabelecidos as práticas agronómicas de produção de oleaginosas, e desenvolvidos os métodos de processamento e recuperação dos óleos obtidos.

Anexos



Crypthecodinium conhii (Seligo) CCMP 316. Ampliação ($\times 1000$)

Anexo 1 – Alfarroba

Alfarroba

A alfarroba é o fruto da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua L.*), uma planta do género *Ceratonia* que pertence à família das Leguminosae da ordem Rosales (Batlle & Tous, 1997).

A alfarrobeira cresce desde a antiguidade na maior parte dos países mediterrâneos que apresentam climas amenos e secos com solos pobres e pedregosos. Mais recentemente foi levada para outras zonas do globo tais como a Califórnia, Arizona (E.U.A), México, Chile, Argentina, Austrália, África do Sul e Índia (Batlle & Tous, 1997) (fig. A1-1).



Figura A1-1 – Distribuição geográfica mundial e zonas de origem da alfarrobeira (Batlle & Tous, 1997).

A produção mundial de alfarroba está estimada em aproximadamente 310000 ton/ano, provenientes de 200000 ha com diferentes características dependendo da região de cultivo e práticas agrícolas empregues. A Espanha apresenta-se como líder na produção de alfarroba, produzindo em média 135.000 ton/ano, imediatamente seguida pela Itália (45000 ton/ano), Portugal (30000 ton/ano), Marrocos, Grécia, Chipre, Turquia, Argélia bem como outros países com menor produção (Batlle & Tous, 1997).

A alfarroba é uma vagem indeiscente, alongada e comprimida, direita ou curvilínea, que tem ente 10 e 30 cm de comprimento, 1,5-3,5 cm de largura e cerca de 1 cm de espessura (Batlle & Tous, 1997). Apresenta uma cor castanha e uma superfície enrugada com uma textura semelhante ao cabedal (Batlle & Tous, 1997).

A alfarroba possui dois constituintes principais: a polpa (90 % em massa) e as sementes (10%) (Batlle & Tous, 1997; Curtis & Race, 1998; Race et al., 1999). A polpa é constituída por uma camada exterior (pericarpo) e por uma região interna (mesocarpo), mais mole. As sementes dispõem-se transversalmente, separadas pelo mesocarpo; são duras e numerosas e apresentam uma forma oblonga comprimida, 8-10 mm de comprimento, 7-8 mm de largura e 3-5 mm de espessura (Batlle & Tous, 1997).

A composição química da polpa depende de factores como a origem, o método de cultivo e a época da colheita. A polpa é muito rica em açúcares totais (48-56%) sobretudo sacarose, glucose, frutose e maltose (tabela A1-1) e contém cerca de 18% de celulose e hemicelulose (Batlle & Tous, 1997).

Tabela A1-1 – Composição típica média da alfarroba (Batlle & Tous, 1997).

| Constituinte | % |
|----------------------------------|---------|
| Açúcares totais | 48-56 |
| Sacarose | 32-38 |
| Glucose | 5-6 |
| Frutose | 5-7 |
| Pinitol | 5-7 |
| Taninos condensados | 18-20 |
| Polissacáridos (excluindo amido) | 18 |
| Cinzas | 2-3 |
| Lípidos | 0,2-0,6 |

A composição mineral (em mg/100g de polpa seca) é a seguinte: K=1100, Ca=307, Fe=104, Mg=42, Na=13, Zn=0,59, Mn=0,4, Cu=0,23 (Batlle & Tous, 1997). Nos lípidos, existem porções aproximadamente iguais de ácidos gordos saturados e insaturados. Nos extractos de alfarroba foram ainda detectados sete aminoácidos: alanina, glicina, leucina, prolina, valina, tirosina e fenilalanina (Batlle & Tous, 1997; Zografakis & Dasenakis, 2002). A alfarroba, no seu estado de maturação, contém uma grande quantidade de taninos condensados (16-20%) (Calixto & Cañellas, 1982; Batlle & Tous, 1997; Cantalejo, 1998; Makris & Kefalas, 2004).

Alguns testes realizados em animais revelaram que a polpa de alfarroba contém apenas 1-2 % de proteína digerível, e possui uma energia metabólica relativamente baixa (Batlle & Tous, 1997). A baixa digestibilidade da proteína deve-se ao facto da mesma se encontrar ligada a taninos e fibras (Batlle & Tous, 1997).

A semente é constituída (em massa) por uma camada superficial (30-33%), pelo endosperma (42-46%) e pelo embrião ou gérmen (23-25%). A camada superficial (*coat*) é constituída principalmente por antioxidantes. O endosperma é composto pela galactomanana, goma de semente de alfarroba (*carob bean gum* - CBG) também designada por *locust bean gum* (LBG) (Curtis & Race, 1998; Batlle & Tous, 1997; Makris & Kefalas, 2004). Trata-se de um polissacarídeo composto por uma unidade de manose e outra de galactose (numa proporção de 4:1), que é muito semelhante à goma de tara (3:1) e goma de guar (2:1) (fig. A1-2).

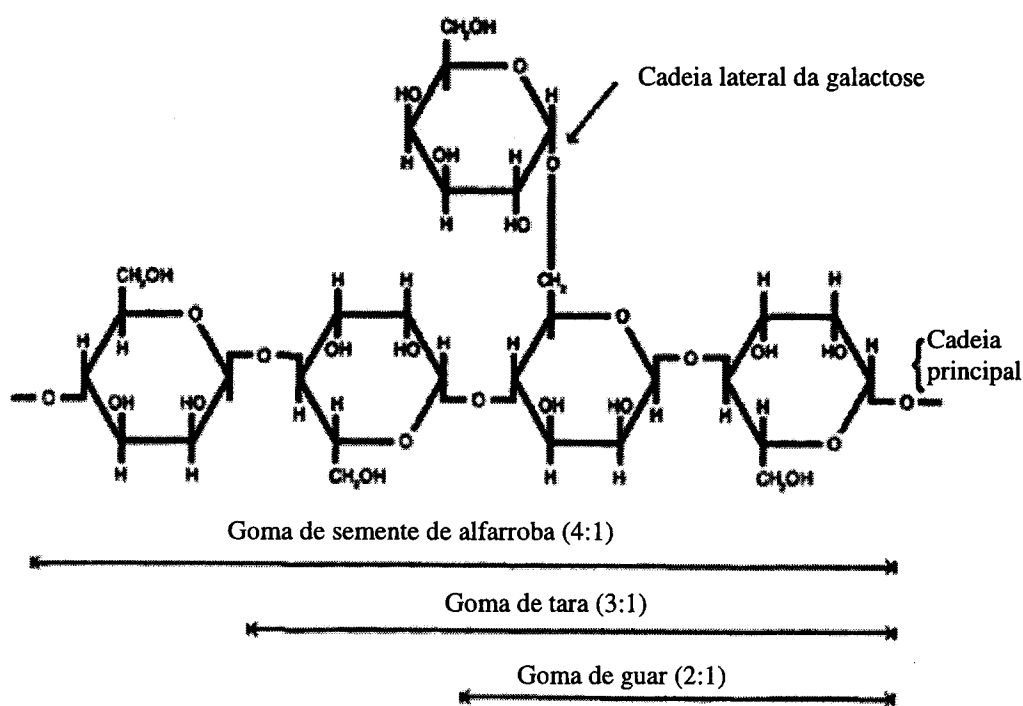


Figura A1-2 – Estrutura molecular de três galactomananas: goma de semente de alfarroba, *carob bean gum* (CBG), goma de tara e goma de guar (Batlle & Tous, 1997).

A alfarroba é utilizada depois de esmagada de forma a separar a semente da polpa (Batlle & Tous, 1997). As sementes, apesar de constituírem apenas 10% do peso total da alfarroba, são responsáveis pela maior fonte de rendimento actual da indústria de alfarroba – produção de goma de alfarroba. Esta é utilizada como espessante,

estabilizante, emulsificante e gelificante em diversas indústrias, tais como, alimentar, têxtil, de papel, farmacêutica, de alimentos para animais e de cosmética (Calixto & Cañellas, 1982; Batlle & Tous, 1997).

A polpa de alfarroba pode ser utilizada directamente, na alimentação humana e animal, ou como matéria-prima para a indústria (Albanell et al., 1991).

A polpa pode ser moída e transformada num pó fino e utilizada na indústria alimentar. Este pó, com 46% de açúcar, 7% de proteína e quantidades vestigiais de minerais e vitaminas, é bastante nutritivo e, depois de seco por aquecimento, pode ser adicionado a bolos, pão, doces, gelados, ou bebidas como intensificante organoléptico (Batlle & Tous, 1997).

A utilização da polpa de alfarroba como ração para animais apresenta alguns problemas que se prendem com o baixo valor proteico da mesma (Batlle & Tous, 1997) e com o elevado teor em polifenóis condensados (Calixto e Cañellas, 1982; Roseiro *et al.*, 1991a). Alguns investigadores têm sugerido que os taninos condensados são os responsáveis pelo aumento do efeito depressivo verificado em animais submetidos a uma dieta baseada em polpa de alfarroba enquanto outros acreditam que este efeito pode dever-se ao baixo conteúdo energético da polpa e poderá ser compensado aumentando o consumo de polpa de alfarroba (Batlle & Tous, 1997).

Sendo a polpa de alfarroba rica em açúcares de fácil extracção, pode ser utilizada como matéria-prima para produção de xaropes com aplicação na formulação de meios de cultura (líquidos, sólidos ou semi-sólidos) para fermentação (Calixto & Cañellas, 1982; Roseiro et al., 1991a,b; Petit & Pinilla, 1995). Alguns autores têm utilizado meios de cultura contendo xarope de alfarroba para produção de proteínas por *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizopus oligosporus* ou *Monascus ruber* (Calixto & Cañellas, 1982), xantano por *Xanthomonas campestris* (Roseiro et al., 1992; Albergaria et al., 1999) mas, até à data, não existem referências à utilização de xarope de alfarroba para a produção de PUFA's à excepção deste trabalho (capítulo 3). A aplicação da polpa de alfarroba, como ingrediente para meios de fermentação de produtos de elevado valor acrescentado, é uma opção que permite aumentar significativamente a sua procura e valorizar este recurso. Constitui, assim, um estímulo para desenvolvimento do sector agrícola regional e nacional.

Referências:

Albanell, E., Caja, G. and Plaixats J. (1991). Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. *Options Méditerranéennes* 16:135-136.

Albergaria, H., Roseiro, J.C. and Amaral-Collaço, M.T. (1999). Technological aspects and kinetic analysis of microbial gum production on carob. *Agro Food Ind. Hi Tec.* 10:24-26.

Batlle, I. and J. Tous (1997). Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp.1-78.

Calixto, F.S. and Cañellas, J. (1982). Components of Nutritional Interest in Carob Pods (*Ceratonia Siliqua*). *J. Sci. Food Agric.* 33:1319-1323.

Cantalejo, M.J. (1998). Effects of condensed polyphenols from carob pods on bioactivity assays. *2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry* (ECSOC-2), 1-30 September, Available at <http://ecsoc2.hcc.ru/ecsoc-2/dp023/dp023.htm>, last accessed 30/10/09.

Curtis, A. and Race, D. (1998). Carob Agroforestry in the Low Rainfall Murray Valley: A market and economic assessment. Rural Industries Research & Development Corporation, Publication n° 98/8.

Makris, D.P. and Kefalas, P. (2004). Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a Source of Polyphenolic Antioxidants. *Food Technol. Biotechnol.* 42(2):105-108.

Race, D., Curtis, A. and Booth, W. (1999). Carob agroforestry industry: an assessment of its potential for the low-medium rainfall Murray Valley region. *Aust. J. Exp. Agr.* 39:325-334.

Roseiro, J.C., Gírio, F. and Collaço, M.T.A (1991a). The Influence of Storage Stability on the use of Carob Pulp Aqueous Extract as Raw Material for Fermentation Processes. *Leben. Wiss. Technol.* 24:508-512.

Roseiro, J.C., Gírio, F.M. and Collaço, M.T.A. (1991b). Yield Improvements in Carob Sugar Extraction. *Process Biochem.* 26: 179-182.

Roseiro, J.C., Costa, D.C. and Amaral-Collaço, M.T. (1992). Batch and Fed-batch Cultivation of *Xanthomonas campestris* in Carob Extracts. *Leben. Wiss. Technol.* 25:289-293.

Petit, M.D. and Pinilla, J.M. (1995). Production and Purification of a Sugar Syrup from Carob Pods. *Leben. Wiss. Technol.* 28:145-152.

Anexo 2 – Efeito da temperatura no crescimento e composição em ácidos gordos de *C. cohnii*

A temperatura afecta a velocidade das reacções celulares, o metabolismo, as necessidades nutricionais e a composição da biomassa (Richmond, 1986).

Para manter as funções fisiológicas normais da membrana, tem sido referida a síntese de ácidos gordos a baixas temperaturas em muitas espécies microbianas (Yongmanitchai & Ward, 1989). Contudo, a resposta das algas à temperatura é específica da espécie e depende da temperatura óptima de cada espécie (Cobelas, 1989).

Estudou-se o efeito da temperatura na taxa específica de crescimento, concentração de biomassa, composição em ácidos gordos e teor em DHA de *C. cohnii* a crescer em meio definido *f/2+NPM* (Anexo 3) modificado.

As curvas de crescimento apresentam-se na figura A2.1 e os correspondentes parâmetros de crescimento estão tabelados na tabela A2.1.

Como se pode observar na tabela A2.1, o aumento da taxa específica de crescimento é acompanhado por um aumento da concentração de biomassa ao fim de 76 h e ambos são função da temperatura de crescimento.

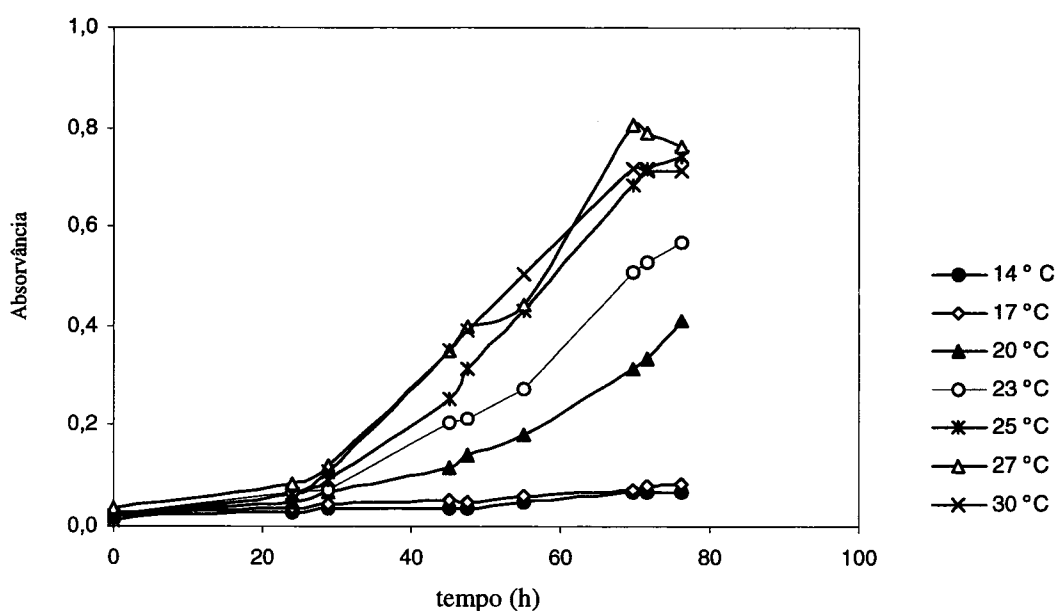


Figura A2.1 – Efeito da temperatura no crescimento de *C. cohnii* CCMP 316. Os resultados são expressos como a média de três réplicas independentes.

Tabela A2.1 – Efeito da temperatura na taxa específica de crescimento, no tempo de duplicação e na absorvância (540 nm) após 76 horas. Os valores são expressos como a média de pelo menos duas réplicas independentes e respectivos desvios padrão.

| | Temperatura (°C) | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 17 | 20 | 23 | 25 | 27 | 30 |
| μ (h ⁻¹) | 0,022±0,00 | 0,039±0,00 | 0,055±0,00 | 0,064±0,00 | 0,075±0,00 | 0,072±0,00 |
| Tempo de duplicação (h) | 31,99 | 17,82 | 12,51 | 10,82 | 9,26 | 9,63 |
| Absorvância 540 nm (após 76 h) | 0,053±0,03 | 0,386±0,03 | 0,546±0,02 | 0,731±0,09 | 0,862±0,02 | 0,694±0,12 |

A temperatura óptima de crescimento obtida para a *C. cohnii* CCMP 316 foi 27°C (fig. A2.2). A esta temperatura a taxa específica de crescimento atingiu o valor máximo (0,075 h⁻¹) tendo-se obtido uma absorvância de 0,862.

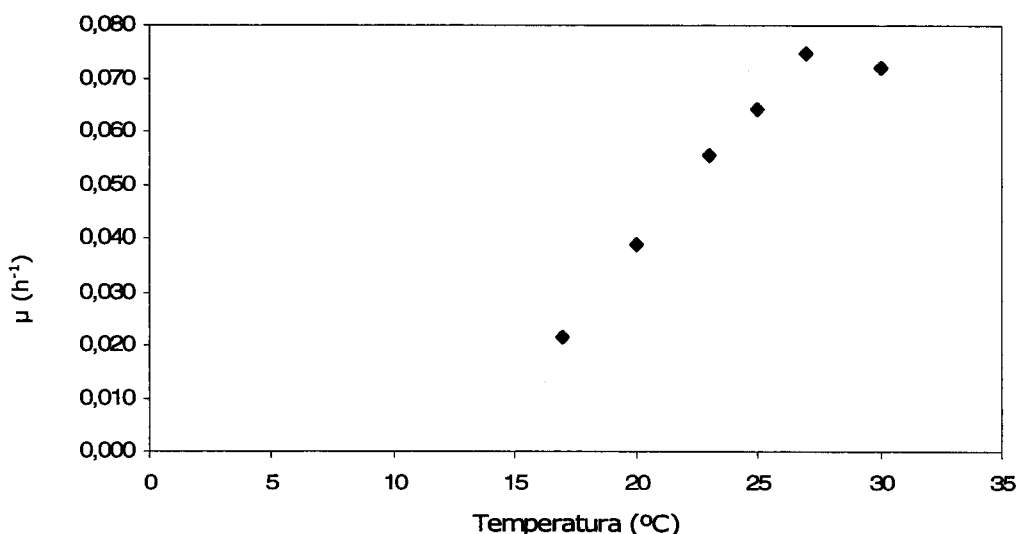


Figura A2.2 – Efeito da temperatura na taxa específica de crescimento de *C. cohnii* a crescer em meio f/2 + NPM suplementado com glucose (3,8 gL⁻¹).

Para temperaturas inferiores à óptima, um aumento de temperatura traduziu-se num aumento da taxa específica de crescimento e da biomassa ao fim de 76 h tal como

seria de esperar atendendo a que as temperaturas baixas reduzem a actividade enzimática na glicólise e no ciclo e Krebs e, conseqüentemente o metabolismo da fonte de carbono decresce, a taxa de consumo de substrato diminui e o rendimento biomassa/substrato é afectado (Jiang & Chen, 2000b).

Acima da temperatura óptima observou-se uma diminuição da taxa específica de crescimento e da biomassa. À temperatura de 14°C, embora não tenha ocorrido morte, não se observou crescimento.

Os resultados obtidos estão de acordo com os de Tuttle & Loeblich (1975). Estes autores concluíram que *C. cohnii* (Woods Hole strain d) crescia na gama de temperaturas de 20-35° C, com um óptimo a 27°C, e que para temperaturas superiores a 30°C, o crescimento era caracterizado por uma divisão anormal e por um tempo de duplicação superior. Os estudos de Beach & Holz (1973) também indicavam que o crescimento da *C. cohnii* (Javornicky) era inibido quando as temperaturas se situam abaixo dos 14°C e acima dos 31°C.

Jiang & Chen (2000 b) referiram um aumento da taxa específica de crescimento e da biomassa de *C. cohnii* (ATCC 30556) com o aumento da temperatura dos 15-30 °C. Estes autores obtiveram uma taxa específica de crescimento máxima à temperatura de 30°C, mas não estudaram a temperatura de 27°C. Contudo, de Swaaf (2003) obteve absorvâncias superiores a 30°C comparativamente às obtidas a 27°C (5,8 e 4,7, respectivamente) para *C. cohnii* (ATCC 30772) facto que poderá indicar que a temperatura óptima de crescimento desta estirpe pode ser mais elevada.

Os valores obtidos para a taxa específica de crescimento de *C. cohnii* (CCMP316) são inferiores aos obtidos por Jiang & Chen (2000 b) (0,092 h⁻¹ a 30 °C) para a estirpe ATCC 30556 mas, além da estirpe ser diferente os autores utilizaram outro meio de cultura (mais rico em glucose).

Está bem estabelecido que os microrganismos se adaptam fenotipicamente à temperatura de crescimento e que para as temperaturas mais baixas as percentagens de ácidos gordos, sobretudo poli-insaturados, aumentam de forma a garantir a fluidez dos lípidos de membrana (Jiang & Chen, 2000 b). Contudo *C. cohnii* CCMP 316 responde às baixas temperaturas (14, 17 e 20 °C) produzindo 16:0, 18:0 e 18:1 ω 9, os quais constituem mais de 70 % do total de ácidos gordos (Tabela A2.2). Apesar disso, à temperatura mais elevada (30 °C), a microalga aumenta a percentagem de ácidos gordos saturados (12:0, 14:0 e 16:0), os quais constituem 76,2% do total de ácidos gordos tal como foi descrito para *C. cohnii* 30556 (Jiang & Chen, 2000 b).

Tabela A2.2 – Efeito da temperatura no perfil de ácidos gordos de *C. cohnii*. Os resultados são expressos como a média de pelo menos 4 injeções (duas réplicas independentes injectadas duas vezes).

| Ácido gordo | Temperatura (°C) | | | | | |
|-------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|
| | % do total de ácidos gordos (média±desvio padrão) | | | | | |
| | 14 | 17 | 20 | 23 | 27 | 30 |
| 12:0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 1.6±0.1 | 1.1±0.1 | 2.6±0.3 |
| 14:0 | 3.5±2.3 | 4.4±0.6 | 10.2±3.8 | 9.9±0.8 | 13.4±2.3 | 18.7±1.2 |
| 16:0 | 31.0±1.1 | 30.5±0.7 | 34.7±3.7 | 29.0±0.6 | 32.1±1.4 | 45.9±0.9 |
| 18:0 | 27.3±2.8 | 29.7±2.3 | 16.5±4.1 | 8.5±0.5 | 7.6±1.4 | 9.3±1.3 |
| 18:1ω9 | 26.8±1.6 | 22.6±0.1 | 20.2±3.7 | 15.8±0.5 | 11.6±0.6 | 12.0±0.8 |
| 22:5 | 7.0±3.5 | 4.7±1.2 | 0.0±0.0 | 4.7±2.1 | 1.5±0.2 | 0.0±0.0 |
| 22:6 | 4.4±1.1 | 8.0±0.1 | 18.4±0.9 | 30.6±1.6 | 32.6±2.0 | 11.4±2.2 |
| ΣSFAs | 61.9 | 64.6 | 61.4 | 49.0 | 54.2 | 76.6 |
| ΣMUFAs | 26.8 | 22.6 | 20.2 | 15.8 | 11.6 | 12.0 |
| ΣPUFAs | 11.4 | 12.7 | 18.4 | 35.2 | 34.1 | 11.4 |

ΣSFAs – somatório dos ácidos gordos saturados; ΣMUFAs – somatório dos ácidos gordos mono-insaturados; ΣPUFAs – somatório dos ácidos gordos poli-insaturados

A percentagem de DHA foi mínima a 14 °C (4,4 % do total de ácidos gordos), atingiu um máximo a 27 °C (32,6% do total de ácidos gordos) e baixou ligeiramente a 30 °C (11,4 % do total de ácidos gordos). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por de Swaaf et al. (1999) que obtiveram uma percentagem máxima de DHA para *C. cohnii* ATCC 30772 a 27 °C. Contudo, Jiang & Chen (2000b) obtiveram percentagens máximas de DHA para *C. cohnii* ATCC 30556 a 15 -25 °C.

Referências:

- Beach, D.H. and Holz, G.G. (1973). Environmental influences on the docosahexaenoate content of the triacylglycerols and phosphatidylcholine of a heterotrophic, marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. *Biochim. Biophys. Acta* 316:56-65.
- Cobelas, M.A. (1989). Lipids in Microalgae. A review II. Environment. *Grasas Aceites* 40(3):213-223.
- de Swaaf, M. E., de Rijk T. C., Eggink, G., and Sijtsma L. (1999). Optimization of Docosahexaenoic Acid Production in Batch Cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *J. Biotechnol.* 70:185-192.
- de Swaaf, M.E. (2003). Docosahexaenoic Acid Production by the Marine Alga *Cryptocodinium cohnii*. Doctoral Thesis, Delft University, Delft University Press, The Netherlands.
- Jiang, Y. and Chen, F. (2000b). Effects of Temperature and Temperature Shift on Docosahexaenoic Acid Production by the Marine Microalga *Cryptocodinium cohnii*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77(6):613-617.
- Richmond, A. E. (1986). Microalgal culture. *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 4(4): 369-438.
- Tuttle, R.C. and Loeblich, A.R. (1975). An Optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phycologia* 14(1):1-8.
- Yongmanitchai, W. and Ward, O.P. (1989). Omega-3 Fatty Acids: Alternative Sources of Production. *Process Biochem.* 117-125.

Anexo 3 – Meio de cultura f/2+NPM

Meio de cultura f/2 modificado

O meio f/2 modificado é preparado adicionando os componentes do meio f/2 (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975) listados na tabela A3-1 (onde o NaNO_3 foi substituído por NH_4Cl), a 900 mL de água do mar (artificial) e prefazendo o volume a 1 L, com água do mar (artificial).

Tabela A3.1 – Composição do meio de cultura f/2.

| Quantidade | Composto | Solução Stock |
|------------|--|---------------|
| 1 mL | NH_4Cl | 47 g/L |
| 1 mL | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 5 g/L |
| 1 mL | solução de metais f/2 | (tabela A3-2) |
| 0,5 mL | solução de vitaminas f/2 | (tabela A3-3) |

Tabela A3.2 – Composição da solução de metais traço f/2.

| Quantidade | Composto | Solução Stock |
|------------|--|---------------|
| 3,15 g | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | - |
| 4,36 g | $\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | - |
| 1 mL | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 9,8 g/L |
| 1 mL | $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 6,3 g/L |
| 1 mL | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 22,0 g/L |
| 1 mL | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 10,0 g/L |
| 1 mL | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 180,0 g/L |

Tabela A3.3 – Composição da solução de vitaminas f/2¹.

| Quantidade | Composto | Solução Stock |
|------------|---|---------------|
| 1 mL | Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina) | 1,0 g/L |
| 10 mL | Biotina | 0,1 g/L |
| 200 mg | Tiamina.HCl | - |

¹Filtrada estéril (filtro Gelman Sciences Supor ®-200, 0,2 µm)

Meio de cultura f/2+NPM modificado

O meio f/2 +NPM modificado é preparado adicionando os componentes do meio f/2 a água do mar (artificial) e 100 mL de solução orgânica stock sem glucose (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975), onde a neopeptona foi substituída por bactopectona e tryptcasepeptona (tabela A3.4).

Tabela A3.4 – Composição da solução orgânica stock.

| Quantidade | Composto |
|------------|--|
| 1 g | Acetato de Sódio |
| 6 g | Glucose |
| 3 g | (di-) Succinato de Sódio.6H ₂ O |
| 2 g | Bactopectona |
| 2 g | Tryptcasepeptona |
| 1 g | Triptona |
| 0,100 g | Extracto de levedura |

Depois de preparados, os meios de cultura (sem glucose) são esterilizados em autoclave (20 min, à temperatura de 121°C e à pressão de 1,2 atm). Uma solução mãe de glucose, autoclavada separadamente, é adicionada (em câmara de fluxo laminar), na quantidade pretendida, antes da inoculação.

Referências:

Guillard, R.L. and Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve, *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.

Guillard, R.L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine, Invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals*, W.L. Smith, M.H. Chanley (Eds.), Plenum Press, New York, USA, pp.26-60.

Anexo 4 – Cálculo das concentrações dos ácidos gordos separados por cromatografia gás-líquido

Cálculo das concentrações dos ácidos gordos por cromatografia gasosa

A técnica de cromatografia gás-líquido sendo de grande utilidade na separação de compostos em sistemas bioquímicos, nomeadamente de ácidos gordos em amostras biológicas, apresenta, no entanto, o inconveniente de não ser suficientemente precisa devido à fraca reproductibilidade na medição de pequenos volumes de amostra (poucos microlitros), que são injectados num sistema que está a uma pressão e temperaturas superiores à ambiente. Uma maneira de obviar este inconveniente é utilizar a técnica do padrão interno, em que se efectua a calibração das áreas dos picos correspondentes aos ácidos gordos da amostra, em relação a um composto padrão adicionado (Gonçalves, 1983).

A relação entre a massa de ácido gordo i ($C_i \times V$) e a respectiva área sob o pico cromatográfico (A_i) é dada por:

$$A_i = f_i \times C_i \times V \quad (A1)$$

onde V é o volume de amostra injectado e f o factor de proporcionalidade, designado por factor de resposta. O valor de f depende do tipo de detector, da natureza química do componente e também do caudal do gás de arraste. Para o padrão interno, a relação será:

$$A_p = f_p \times C_p \times V \quad (A2)$$

em que o índice P se refere ao padrão interno.

A razão entre as duas expressões, A1 e A2, será:

$$\frac{A_i}{A_p} = \frac{f_i}{f_p} \times \frac{C_i}{C_p} \quad (A3)$$

e, deste modo elimina-se o volume de solução injectado.

Prepararam-se cinco soluções de referência com concentrações constantes de padrão interno e concentrações variáveis de mistura certificada (GLC-462 Nu-Chek-Prep,

Elysian, USA) e traçaram-se curvas de calibração entre a razão entre as áreas dos picos correspondentes ao ácido gordo i e ao padrão interno ($\frac{A_i}{A_p}$) em função da concentração do ácido gordo i .

O composto escolhido para padrão interno não deve estar presente na amostra e, o seu tempo de retenção não deve sobrepor-se ao de nenhum componente da amostra. O padrão interno mais utilizado na análise de ácidos gordos de microalgas é o ácido heptadecanóico (17:0) (Jiang & Chen, 1999; Jiang & Chen, 2000a). Para o cálculo dos factores de resposta foi utilizado o éster metílico do ácido heptadecanóico na concentração de 5,3 mgmL⁻¹.

Referências:

Gonçalves, M.L.S.S. (1983). Cromatografia em fase gasosa in: *Métodos Instrumentais para análise de soluções. Análise quantitativa*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp.553-592.

Jiang, Y. and Chen, F. (1999). Effects of salinity on cell growth and docosahexaenoic acid content in the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:508-513.

Jiang, Y. and Chen, F. (2000a). Effects of medium glucose and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochem.* 35:1205-1209.

Handwritten signature
24.11.201

Errata

| Pag. | linha | Onde se lê | Deverá ler-se |
|-------|-------|---|--|
| xvi | 27 | inserir "Abstract.....229" | |
| xvi | 31 | Carob pulp extraction | Carob pulp syrup extraction |
| xvii | 7 | inserir "Abstract.....239" | |
| xvii | 25 | inserir "Summary.....251" | |
| xvi | 33 | Bioreactor fermentation | Bioreactor fermentations |
| xviii | 33 | e produção de DHA por | e composição em ácidos gordos de |
| 3 | 12 | possuiu | possui |
| 3 | 20 | Burdger, 2006 | Burdge, 2006 |
| 3 | 31 | godos | gordos |
| 4 | 23 | espera venham | espera que venham |
| 6 | 5 | permitea | permite |
| 6 | 13 | glucose, frutose, glicerol | glucose |
| 6 | 13 | e azoto | e de azoto |
| 9 | 28 | <i>Aplied</i> | <i>Applied</i> |
| 13 | 15 | animais superiores | animais |
| 14 | 26 | têm de | têm de ser |
| 16 | 11 | Voet, 1999 | Voet et al., 1999 |
| 17 | 1 | Wade, 1995; | Wada, 1995; |
| 18 | 22,23 | não ser ainda completamente conhecida | não serem ainda completamente conhecidas |
| 19 | | 18:ácido linoleico | 18:2 ácido linoleico |
| | | 20:5eicosapentaenóico | 20:5 ácido eicosapentaenóico |
| | | 22:5docosapentaenóico | 22:5 ácido docosapentaenóico |
| | | 24:5tetracosapentaenóico | 24:5 ácido tetracosapentaenóico |
| | | 24:6teracosahexaenóico | 24:6 ácido tetracosahexaenóico |
| | | 22:6docosapentaenóico | 22:6 ácido docosahexaenóico |
| 20 | 26 | estequiometria | esterioquímica |
| 22 | 5 | fig. 4 | fig. 5 |
| 23 | 16 | fig. 4 | fig. 5 |
| 23 | 25,26 | a, 2009). | Christie, 2009a). |
| 28 | 24 | hidratos de carbono | glicídios |
| 29 | 17 | fig. 7 | fig. 8 |
| 30 | 5 | Lado | LA do |
| 30 | 10 | 11 g de ALA a EPA | 11 g de ALA a 1 g de EPA |
| 32 | 14 | Nuclear Factor Kappa B | <i>Nuclear Factor Kappa B</i> |
| 34 | 27 | (Salonen et al., 1995; Mozaffarian & Rim 2006) numa | (Salonen et al., 1995). Mozaffarian & Rim (2006), numa |
| 36 | 21 | doença de Crohn's | doença de Crohn |



Handwritten signature and date:
24.11.201

| | | | |
|----|-------------|---|--|
| 38 | 8 | pré-enclâmpsia | pré-enclampsia |
| 43 | 5 | lentilhas e em sementes como soja, linhaça, colza e nozes | lentilhas, em sementes como soja, linhaça e colza e em nozes |
| 43 | 11 | boragem | borragem |
| 44 | 27 | ambiental dos ambientes marinhos | dos ambientes marinhos |
| 49 | 9 | Exploração de fontes microbianas | Exploração comercial de fontes microbianas |
| 49 | 18 | boragem | borragem |
| 51 | 22 | fotobioreactor | fotobiorreactor |
| 53 | 10,19 | fotobioreactor | fotobiorreactor |
| 53 | 18 | bioreactor | biorreactor |
| 54 | 17 | dos mercado | do mercado |
| 55 | 4 | de perfusão | em perfusão |
| 55 | 17 | produção de EPA | produção comercial de EPA |
| 55 | 22 | 4,7,10,14,16 e 19 | 4,7,10,13,16 e 19 |
| 58 | 7 | <i>Thraustochytrium</i> | <i>Thraustochytrium</i> |
| 59 | 4,5 | com maior ponto de fusão mais elevado | com ponto de fusão mais elevado |
| 59 | 23 | desengorduramento, | remoção de gomas, |
| 62 | 12 | <i>Schizochytrium</i> | <i>Schizochytrium</i> |
| 64 | 16 | que determinaram | determinaram |
| 64 | 23,27,29,32 | bioreactor | biorreactor |
| 65 | 14 | era | é |
| 68 | 34 | foi ligeiramente inferior 0,047 h ⁻¹ | foi inferior, 0,047 h ⁻¹ |
| 70 | 28 | ácidos gordos totais | ácidos gordos |
| 73 | 3 | <i>Schizochytrium</i> | <i>Schizochytrium</i> |
| 73 | 15 | (Bjapai et al., 1991b); Li & Ward,1994) | (Bjapai et al., 1991b; Li & Ward,1994) |
| 73 | 28,29 | hidratos de carbono | glícidos |
| 73 | 30 | dextrano, ácido oleico | dextrano e ainda ácido oleico |
| 75 | 13 | <i>Schizochytrium</i> | <i>Schizochytrium</i> |
| 76 | 6 | obtiveram-se | obtiveram |
| 76 | 28 | <i>Schizochytrium</i> | <i>Schizochytrium</i> |
| 77 | 13 | teores relativos | teores |
| 77 | 18 | fontes de carbono | fontes de azoto |
| 78 | 14 | bioreactor | biorreactor |
| 81 | 22 | bioreactor | biorreactor |
| 83 | 4 | plausível | consensual |

24.11.2010

| | | | |
|-----|-------------|--|--|
| 84 | 12 | bireactor | biorreactor |
| 84 | 25,26,27 | eliminar “De acordo com Mendonza....CCMP 316” | |
| 84 | 29 | de oxigénio | do oxigénio |
| 85 | 19 | ácidos saturados | ácidos gordos saturados |
| 86 | 9 | teor relativo | teor |
| 88 | 7 | ATCC30556 | ATCC 30556 |
| 88 | 8,9 | um teor de DHA superior (57,64%) relativamente ao total de ácidos gordos | uma percentagem relativa de DHA superior (57,64%) |
| 88 | 18,20,22,23 | <i>Shchizochytrium</i> | <i>Schizochytrium</i> |
| 88 | 24 | design | <i>design</i> |
| 88 | 31 | A produção máxima | As produções máximas |
| 89 | 13 | <i>Traustchytrium</i> | <i>Thraustochytrium</i> |
| 89 | 30 | de 10 e 35 °C | de 10 a 35 °C |
| 90 | 10 | dentro do qual | dentro da qual |
| 90 | 26 | <i>Traustchytrium</i> | <i>Thraustochytrium</i> |
| 91 | 1 | <i>Shizochytrium</i> | <i>Schizochytrium</i> |
| 91 | 17 | <i>Thaustochytrium</i> | <i>Thraustochytrium</i> |
| 91 | 30 | um teor de DHA superior | uma percentagem relativa de DHA superior |
| 92 | 11 | <i>C.cohnii</i> | <i>C. cohnii</i> |
| 93 | 13 | <i>Schizochytrium</i> <i>Thraustochytrium</i> | <i>Schizochytrium e Thraustochytrium</i> |
| 93 | 31 | são máximas | foram máximas |
| 94 | 26 | descrevem | descreveram |
| 95 | 3 | <i>Thaustochytrium</i> | <i>Thraustochytrium</i> |
| 100 | 10,13 | <i>et al.</i> | <i>et al.</i> |
| 100 | 31,32 | biomassa <i>Schizochytrium</i> | biomassa de <i>Schizochytrium</i> |
| 102 | 28 | ao descrita | ao descrito |
| 103 | 24 | por Perret et al. (1993) | elaborada por Perret et al. (1993) |
| 105 | 11 | Moreau e tal., 1998 | Moreau et al., 1998 |
| 106 | 20 | sugeriu | sugeriram |
| 107 | 11 | divisão <i>Syndinea</i> | sub-divisão <i>Syndinea</i> |
| 108 | 1 | <i>Crypthecodinium</i> | <i>Crypthecodinium</i> |
| 108 | 2 | 4 células que são libertadas filhas | 4 células filhas que são libertadas |
| 108 | 13 | surgem | sugerem |
| 109 | 8 | “ponte de fertilização” | “ponte de fertilização” (Bhaud et al., 1988) |
| 109 | 9,10 | eliminar “ O número de flagelos (Bhaud et al., 1988).” | |

Almeida
Elaine
 24.11.2010

| | | | |
|-----|--------------|---|--|
| 110 | 1 | 2:6(n-3) | 22:6(n-3) |
| 110 | 6 | triacilgliceróis | triacilgliceróis |
| 110 | 26 | (Withers et al., 1979). | (Withers et al., 1978). |
| 112 | 12 | da estirpe de produção em 242% | dessa estirpe em 242% |
| 113 | Fig.18 | Anti- | Anti-espuma |
| 115 | Fig.20 | Solução Branqueadora | Argila Branqueadora |
| 116 | 22 | flotação | floculação |
| 117 | 4,25 | <i>Shizochytrium</i> | <i>Schizochytrium</i> |
| 119 | 31 | et al. | et al. |
| 120 | 12 | polisacáridos | polissacáridos |
| 124 | 3 | <i>Mortierella</i> | <i>Mortierella</i> |
| 124 | 28 | a concentração | a percentagem relativa |
| 124 | 29 | et al. | et al. |
| 125 | 6 | boragem | borragem |
| 126 | 21 | triacilgliceróis | triacilgliceróis |
| 129 | 30 | boragem | borragem |
| 130 | 8 | 67.7% e 61.8% | 67,7% e 61,8% |
| 130 | 11 | 88.2% | 88,2% |
| 130 | 20 | a maior concentração de EPA | a maior composição percentual de EPA |
| 130 | 22 | gor | gordos |
| 131 | ^a | razão mássica amostra/ureia | razão mássica ureia/ amostra |
| 135 | 6 | FSC | SF |
| 135 | 17 | permitiram | permitiu |
| 136 | 17 | recolha dos solutos extraídos e os custos de recompressão | recolha dos solutos extraídos. Os custos de recompressão |
| 137 | 14 | Intesterificação | Interesterificação |
| 139 | 16 | preparação de PUFAs | preparação de concentrados de PUFAs |
| 139 | 28 | na fracção dos acilgliceróis | na fracção dos acilgliceróis do óleo de atum |
| 140 | 5,6 | Através de vários ciclos | Com dois ciclos |
| 140 | 18 | concentrações de PUFAs | percentagens relativas de PUFAs |
| 140 | 22,25 | <i>Rizopus</i> | <i>Rhizopus</i> |
| 142 | 3,13 | a concentração | a percentagem |
| 142 | 9,11 | usando óleo | usando um extracto de PUFAs ω-3 obtido a partir de óleo |
| 142 | 14 | boragem | borragem |
| 144 | 30 | PUFAs ω-3 | PUFAs ω-3 na forma de ésteres etílicos de EPA e DHA |
| 144 | 31 | <i>Candida cylindracea</i> | <i>Candida antarctica</i> |
| 145 | 2 | 79.6 % | 79,6 % |

| | | | |
|-----|-------------------------|---|---|
| 145 | 5,7,11 | <i>Rhizomucor miehei</i> | <i>Rhizomucor miehei</i> |
| 145 | 21 | lipases de <i>Mucor miehei</i> e <i>Candida antarctica</i> | lipase de <i>de Mucor miehei</i> |
| 146 | 18 | silícico | silícico |
| 147 | 7 | Christie, 1989 | Christie, 2006 |
| 148 | 2ª coluna, 5ª linha | Ésteres metílicos | Ácidos gordos |
| | 13ª linha | 5-100 | 5-105 |
| | 8ª coluna, 19ª linha | 95,68 | 95,8 |
| 150 | 16 | esteres | ésteres |
| 151 | 28 | 64 % | 65,4 % |
| 152 | 11 | em 2,3 vezes | 2,3 vezes |
| 152 | 20 | fusão | ebulição |
| 157 | 9 | Soyer-Gobilard | Soyer-Gobillard |
| 158 | 10 | Nakajuma, M. | Nakajima, M. |
| 159 | 8 | Charactreization of Members | Characterization of Members |
| 160 | 23 | eliminar "Lennon, J.F." | |
| 168 | 23 | Optimization | Optimisation |
| 198 | 12 | <i>Shizochyitium</i> | <i>Schizochytrium</i> |
| 204 | 7 | n-3 into Palm Oil | n-3 PUFA into Palm Oil |
| 210 | 23 | <i>App. Microbio. Biotechnol.</i> | <i>Appl. Microbiol..Biotechnol.</i> |
| 213 | 3 | Docosaehaenoic Acid | Docosaehaenoic Acid Oils |
| 213 | 21 | inserir "Soyer-Gobillard, M.-O., Gillet, B., Géraud, M.-L. and Bhaud, Y. (1999). Dinoflagellate chromosome behavior during stages of replication. <i>Internatl. Microbiol.</i> 2:93-102." | |
| 217 | 20 | and its predador, | and its predator, |
| 217 | 23 | on unicellular red alga | on the unicellular red alga |
| 217 | 15 | analysed flow | analysed by flow |
| 223 | 6 | pp.87-98 | pp.86-98 |
| 223 | 26 | Lipase-Catalyze Acidolysis | Lipase-Catalyzed Acidolysis |
| 279 | 5-8 | eliminar " <i>C. cohnii</i> CCMP 316 fonte de carbono" | |
| 279 | 18,19 | <i>C. cohnii</i> | <i>C. cohnii</i> |
| 279 | 19,20 | eliminar "a taxa específica de crescimento," | |
| 280 | 8-9 | eliminar "testar o crescimento ... glicerol puro" | |
| 280 | 10 | O <i>screening</i> de microrganismos | Identificar microrganismos |
| 280 | 11,14 | Possibilidade de | Estudar a possibilidade de |
| 280 | 16 | estabelecidos | estabelecidas |
| 289 | 17 | CCMP 316. | CCMP 316 a crescer em meio f/2+NPM suplementado com glucose (3,8gL ⁻¹). |

Handwritten signature and date: 24.11.201

| | | | |
|-----|----|--|--|
| 290 | 6 | $\pm 0,00 \dots \pm 0,00 \dots \pm 0,00 \dots \pm 0,00 \dots$ $\pm 0,00 \dots \pm 0,00$ | $\pm 0,004 \dots \pm 0,001 \dots \pm 0,004 \dots \pm 0,003 \dots$ $\pm 0,000 \dots \pm 0,003$ |
| 290 | 10 | $\pm 0,03 \dots \pm 0,03 \dots \pm 0,02 \dots \pm 0,09 \dots$ $\pm 0,02 \dots \pm 0,12$ | $\pm 0,027 \dots \pm 0,028 \dots \pm 0,016 \dots \pm 0,093 \dots$ $\pm 0,016 \dots \pm 0,120$ |
| 291 | 16 | da biomassa | da concentração de biomassa |
| 300 | 3 | do ácido gordo i. | do ácido gordo i. Da expressão (A3) vem que o factor de resposta do componente i pode ser obtido do valor do declive da recta de ajuste dos pontos representados, assumindo que o factor de resposta do padrão interno (f_i) é unitário. |

J. J. Elias
24-11-201