BAKER & MCKENZIE

Baker & McKenzie S.A.S.
NIT: 900.532.339-9

Av. 82 No. 10-62 Piso 6
Bogotá
Colombia

Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakermckenzie.com

Doctor
José Luis Salazar
Director de Nuevas Creaciones
SUPERINTENDENCIA DE INDUS
E. S.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00006-0000
Fecha: 2013-03-01 16:12:50 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 523 RESPUESTA Folios: 24

Referencia: Expediente No. 09.149.183

Solicitud de Patente de Invención titulada: "Métodos y composiciones para la producción de aceites combustibles y oleoquímicos fabricados a partir de microorganismos"

Solicitante: Solazyme, Inc.

RESPUESTA AL AUTO NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA NO. 448 DEL 4 DE DICIEMBRE DE 2012, OFICIO NO. 21971 (EXAMEN DE FONDO)

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ, mayor de edad y vecino de Bogotá D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, doy respuesta al auto emanado por ese Despacho dentro del término legal:

1. **Respuesta a las observaciones del examinador**

1.1 Modificación a una solicitud en trámite

Con el objeto de atender a las observaciones del examinador y de conformidad con el

artículo 34 de la Decisión 486 se presenta un nuevo pliego reivindicatorio como sustituto del anteriormente presentado, en el cual reivindicaciones 1, 3, 6 a 10, 13, 18 y 23-26 se modificaron. Las reivindicaciones 2, 4, 5, 11, 12, 15-17, 20-22 y 27-30 se han eliminado, y se han agregado nuevas reivindicaciones que con la nueva numeración corresponden a las reivindicaciones 2-8, 10,11, 17, 21 y 27 a 30.

El sustento para las modificaciones y las nuevas reivindicaciones se puede encontrar en la descripción originalmente presentada por ejemplo, en las siguientes ubicaciones en la publicación de la solicitud internacional (WO 2008/151149):

Reivindicación 1 – parágrafos 0009 y 0281;
Reivindicaciones 2 y 26 – parágrafo 0062;
Reivindicación 3 – parágrafos 0212 y 0234;
Reivindicaciones 4 a 8 – parágrafos 0195, 0212 y 0234;
Reivindicación 10 – parágrafo 0247;
Reivindicación 11 – parágrafo 0178;
Reivindicaciones 14 y 27 – parágrafo 0180 y Tabla 1;
Reivindicaciones 17 y 30 – parágrafo 0175;
Reivindicación 18 – parágrafos 0009, 0212 y 0234;
Reivindicaciones 21 y 29 – parágrafo 0048;
Reivindicación 25 – parágrafo 0009; y
Reivindicación 28 – parágrafo 0049.

El examinador podrá notar que se han efectuado otras modificaciones para ser consistentes con las anteriores modificaciones, o para modificar la dependencia de las reivindicaciones.

Aunque la solicitante ha modificado las reivindicaciones, note por favor que estas modificaciones no deberían ser interpretadas como aceptación de cualquier posición tomada por el examinador con respecto al alcance de las reivindicaciones pendientes anteriores. En vez de esto, la Solicitante ha modificado las reivindicaciones para definir más específicamente la invención reivindicada y para agilizar el proceso de la solicitud.

1.2 Claridad

Las expresiones "al menos" y "levadura oleaginosa"

Con relación a las expresiones *"al menos"* y *"levadura oleaginosa"* de las reivindicaciones 1, 11, 13 y 25, sin estar de acuerdo con el examinador, el término *"levadura oleaginosa"* ha sido eliminado de las reivindicaciones modificadas.

El término *"al menos 10%"* ha sido remplazado con "10% o más". Mi representante declara que la expresión "10% o más" es clara y concisa, ya que la persona versada en la técnica entendería que las células de microalgas de la presente invención reivindicada puede comprender 10% de lípidos en peso seco, o cualquier porcentaje mayor de porcentaje de lípidos mayor a 10% (por ejemplo, 20%, 50%, 80%, etc., excluyendo 100% porque la célula comprende necesariamente otros componentes tales como proteínas y ácidos nucleicos).

Tipos de Microorganismos y Enzimas:

Las reivindicaciones 1, 11, 13, 25 y 27 se objetaron por considerarse que no son claras por la amplitud de las mencionadas enzimas y microorganismos. El examinador sugiere limitar las reivindicaciones a una generalización razonable de los tipos de microorganismos ensayados y debidamente soportados en la descripción.

Sin estar de acuerdo con el examinador, las reivindicaciones independientes 1, 13 y 25 han sido modificadas para mencionar microalgas y un gen exógeno que codifica una enzima sacarosa invertasa. La solicitante declara que estas características están debidamente sustentadas en la descripción y los ejemplos.

La expresión *"microorganismo homogéneo"*:

La reivindicación 4 ha sido eliminada. Por lo tanto, se da por superada esta objeción.

La expresión *"microalgas de la Tabla 1"*:

Las microalgas identificadas en la Tabla 1 se mencionan ahora expresamente en las reivindicaciones 8 y 27, ya no se hace referencia a la Tabla 1, por lo tanto, se da por superada esta observación.

Estándares del combustible:

El examinador podrá notar que las reivindicaciones 20-22 han sido eliminadas. Por lo tanto, se da por superada esta objeción.

El término *"enzema"*:

Se corrigió el error de traducción en la reivindicación 26, es decir, la palabra correcta es "enzima".

Teniendo en cuenta las modificaciones efectuadas, se concluye que el nuevo pliego reivindicatorio cumple a cabalidad con el artículo 30 de la Decisión 486.

1.3 Novedad

Las reivindicaciones 1-3, 5-7, 9-19, 23 y 24 han sido rechazadas por falta de novedad frente a dos referencias citadas: Y. Chisti, Biotechnology Advances, 25:294-306, 2007 (D1); y la US 2007/0004016 de Picataggio et al. (D2). Las reivindicaciones 25-30 se consideraron nuevas.

La novedad de una solicitud está legalmente definida en el Artículo 16 de la Decisión 486 así: "*una invención se considerará nueva, cuando no está comprendida en el estado de la técnica. El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso de la prioridad reconocida...*"

En virtud de la anterior definición, consideramos que los documentos D1 y D2 no constituyen documentos del arte previo que afecten la novedad de la presente solicitud.

El examinador podrá notar que las reivindicaciones independientes 1, 13 y 25 han sido modificadas para mencionar microalgas que comprenden un gen exógeno que codifica una sacarosa invertasa, lo que se mencionaba en la reivindicación 26. Ninguno de los documentos D1, D2 describen o discuten microalgas que comprenden un gen exógeno que codifica una sacarosa invertasa. En consecuencia, la presente invención reivindicada es novedosa frente al arte previo citado.

1.4 Nivel inventivo

Las reivindicaciones 1-3, 5-7, 9-19, 23 y 24 fueron rechazadas ya que el examinador considera que carecen de nivel inventivo frente a los documentos D1 y D2 mencionados arriba. Las reivindicaciones 25-30 se consideraron inventivas.

El nivel inventivo de una solicitud se encuentra definido en el Artículo 18 de la Decisión 486 y se establece cuando "*si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica*".

Contrario a lo que plantea el Examinador, el documento del arte previo citado no afecta el nivel inventivo de la presente solicitud por cuanto no es posible derivar la presente invención a partir de las enseñanzas presentadas en los documentos D1 y D2.

El examinador podrá notar que las reivindicaciones independientes 1, 13 y 25 han sido modificadas para mencionar microalgas que comprenden un gen exógeno que codifica una sacarosa invertasa, lo que se mencionaba en la reivindicación 26. Ninguno de los documentos D1, D2 describen o discuten microalgas que comprenden un gen exógeno que codifica una sacarosa invertasa. Más aún, la expresión exitosa de una enzima exógena de sacarosa invertasa, como se demostró en los Ejemplos 22 y 23, no es obvia frente al arte previo citado. Así, la presente invención reivindicada tiene nivel inventivo frente a las referencias citadas.

En este orden de ideas, tenemos que la invención propuesta por el solicitante si cumple con los requisitos de patentabilidad y de esta manera es susceptible de ostentar el título de patente de invención.

2. Solicitud Divisional

Por otro lado, de conformidad con el artículo 36 de la Decisión 486 que permite al solicitante presentar divisionales en cualquier momento del trámite sin que se presente ampliación de la solicitud originalmente presentada, me permito presentar una solicitud divisional.

El sustento para las reivindicaciones de la divisional se puede encontrar en la solicitud internacional publicada (WO 2008/151149), por ejemplo, en las siguientes ubicaciones:

Reivindicación 1 – parágrafos 0207, 0212, 0215 y 0281;
Reivindicaciones 2 a 4 – parágrafo 0231;
Reivindicación 5 – parágrafo 0109;
Reivindicaciones 6 a 9 – parágrafos 0229 y0230;
Reivindicación 10 – parágrafo 0247;
Reivindicaciones 11 y 12 – parágrafo 0519;
Reivindicaciones 13 y 14 – parágrafo 0178;
Reivindicaciones 15 y 16 – parágrafo 0310;
Reivindicación 17 – parágrafo 0152;
Reivindicación 18 – parágrafos 0180 y Tabla 1;
Reivindicación 19 – parágrafo 0049;
Reivindicaciones 20 y 21 – parágrafo 0048;
Reivindicación 22 – parágrafo 0178;
Reivindicación 23 – parágrafo 0146; y
Reivindicación 24 – parágrafo 0175.

Para que la anterior divisional surta efecto, adjunto el formulario único de divisional, texto y reivindicaciones así como la tarifa establecida por ese Despacho para este trámite.

BAKER & McKENZIE

En virtud de lo anterior, solicito que se acepten las razones expuestas en el presente documento y en consecuencia, se otorgue el privilegio de patente de invención para el invento que se tramita en este expediente.

Atentamente,

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ
C.C. No. 79.143.366 de Usaquén
T.P. 20.281

Anexos:
- Capítulo reivindicatorio modificado conformado por 30 reivindicaciones
- Recibo de pago por reivindicaciones adicionales
- Formulario único de solicitud divisional
- Descripción, capítulo reivindicatorio de la solicitud divisional conformado por 24 reivindicaciones (formato digital)
- Copia del poder y cesión
-Recibo de pago por reivindicaciones adicionales para la solicitud divisional
- Recibo de pago por presentación de solicitud divisional

BOGMGT/BOGDMS-#1411769-V1-P2009_000285-0720.DOC

REIVINDICACIONES Solicitud de patente No. 09.149.183

1. Un método para producir un lípido, que comprende:

Cultivar una población de microalgas que comprenden un gen exógeno que codifica una sacarosa invertasa en un medio de cultivo que comprende una fuente de carbón fija hasta que las microalgas acumulen 10% o más de su peso de células secas como lípido; y

Separar el lípido de las microalgas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el gen de sacarosa invertasa codifica una enzima secretable de sacarosa invertasa.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la fuente de carbón fija es seleccionada del grupo que consiste de material celulósico despolimerizado, jugo de caña de azúcar, remolacha de azúcar y melazas.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo comprende sacarosa de una fuente seleccionada del grupo que consiste de jugo de caña de azúcar, remolacha de azúcar y melazas, en donde el jugo de caña de azúcar, la remolacha de azúcar y la melaza tienen una concentración de sacarosa de 50 µM o más.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el jugo de caña de azúcar, la remolacha de azúcar o la melaza tienen una concentración de sacarosa de 500 µM o más.

6. El método de la reivindicación 5, en donde el jugo de caña de azúcar, la remolacha de azúcar o la melaza tienen una concentración de sacarosa de 5 mM o más.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el jugo de caña de azúcar, la remolacha de azúcar o la melaza tienen una concentración de sacarosa de 50 mM o más.

8. El método de la reivindicación 7, en donde el jugo de caña de azúcar, la remolacha de azúcar o la melaza tienen una concentración de sacarosa de 500 mM o más.

9. El método de la reivindicación 1, en donde separar el lípido de las microalgas comprende lisar las microalgas por medios mecánicos.

10. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo comprende nitrógeno limitado.

11. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas acumulan un 60% o más de su peso de células secas como lípido

12. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa adicional de formar un producto alimenticio del lípido obtenido de las microalgas.

13. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa adicional de modificar químicamente dicho lípido por hidrólisis de ésteres, transesterificación, hidrotratamiento, hidrocraqueo, desoxigenación, y/o isomerización.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde las microalgas se seleccionan del grupo que consiste de *Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis*

tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Bracteococcus minor, Bracteococcus medionucleatus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora (cepa SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella ovalis, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (incluyendo cualquiera de las cepas UTEX 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta, Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEX LB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp., Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla,

Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, Parachlorella kessleri, Pascheria acidophila, Pavlova sp., Phagus, Phormidium, Platymonas sp., Pleurochrysis carterae, Pleurochrysis dentate, Pleurochrysis sp., Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis, Prototheca zopfii, Pseudochlorella aquatica, Pyramimonas sp., Pyrobotrys, Rhodococcus opacus, Sarcinoid chrysophyte, Scenedesmus armatus, Schizochytrium, Spirogyra, Spirulina platensis, Stichococcus sp., Synechococcus sp., Tetraedron, Tetraselmis sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii, y *Viridiella fridericiana.*

15. El método de la reivindicación 14, en donde las microalgas son seleccionadas del grupo que consiste de *Bracteococcus, Chlorella, Parachlorella, Prototheca, Pseudochlorella,* y *Scenedesmus.*

16. El método de la reivindicación 15, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides* o *Prototheca moriformis.*

17. Un lípido producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

18. Un método para producir combustible que comprende:

(a) cultivar una población de microalgas, en la presencia de una fuente de carbón fija, en donde:

(i) las microalgas expresan una sacarosa invertasa exógena;

(ii) las microalgas acumulan 10% o más de su peso de células secas como lípido;

y

(iii) la fuente de carbón fija se selecciona del grupo que consiste de jugo de caña de azúcar, caña de azúcar, remolacha de azúcar, melaza u otro material de partida que contenga sacarosa

(b) aislar los componentes lípidos del cultivo de microalgas; y

(c) someter los componentes lípidos aislados a una o más reacciones químicas para generar ésteres de ácidos grasos y/o alcanos,

Por lo cual se produce el combustible.

19. El método de la reivindicación 18, en donde una o más reacciones químicas se seleccionan del grupo que consiste de transesterificación, hidrotratamiento, hidrocraqueo, desoxigenación e isomerización.

20. El método de la reivindicación 18 o 19, en donde las microalgas son del gen *Chlorella* o *Prototheca.*

21. El método de la reivindicación 18, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides* o *Prototheca moriformis.*

22. Una composición de alcanos o ésteres de ácidos grasos hechos de acuerdo con el método de la reivindicación 13.

23. El método de la reivindicación 18, en donde los componentes lípidos son sometidos a transesterificación para producir éster(es) de ácidos grasos y glicerol, y el glicerol es agregado a un segundo cultivo de microalgas para ser usado como una fuente de carbón.

24. El método de la reivindicación 23, en donde las microalgas usadas para producir los componentes lípidos y las microalgas del segundo cultivo de microalgas son de las mismas especies.

25. Una célula de microalga que contiene 10% o más de su peso de células secas como lípido y comprende un gen exógeno que codifica una enzima de sacarosa invertasa.

26. La célula de microalga de la reivindicación 25, en donde la enzima de sacarosa invertasa es una enzima de sacarosa invertasa secretable.

27. La célula de microalga de la reivindicación 25 o 26, en donde la microalga es seleccionada del grupo que consiste de *Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Bracteococcus minor, Bracteococcus medionucleatus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora (strain SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella ovalis, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (including any of UTEX strains 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium,*

Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta, Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEX LB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp., Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, Parachlorella kessleri, Pascheria acidophila, Pavlova sp., Phagus, Phormidium, Platymonas sp., Pleurochrysis carterae, Pleurochrysis dentate, Pleurochrysis sp., Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis, Prototheca zopfii, Pseudochlorella aquatica, Pyramimonas sp., Pyrobotrys, Rhodococcus opacus, Sarcinoid chrysophyte, Scenedesmus armatus, Schizochytrium, Spirogyra, Spirulina platensis, Stichococcus sp., Synechococcus sp., Tetraedron, Tetraselmis sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii, y *Viridiella fridericiana.*

28. La célula de microalga de la reivindicación 27, en donde la microalga se selecciona del grupo que consiste de *Bracteococcus, Chlorella, Parachlorella, Prototheca, Pseudochlorella, y Scenedesmus.*

29. La célula de microalga de la reivindicación 28, en donde la microalga es *Chlorella protothecoides* o *Prototheca moriformis.*

30. Un lípido producido por una célula de microalga de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29.

16

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0015974

Bogotá D.C., Febrero 18 de 2013 - 09:33:08

RECIBIDO DE : BAKER NI 900.532.339

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	197970975	15/02/2013	93.623.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	VR CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1603 INVOCAR LA NOTORIDAD DENTRO DE UN TRAMITE DE OPOSICION	450.000.00	450.000.00
				$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

[ ] Conversión [X] División [ ] Fusión

[X] Patente de Invención
[ ] Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

[ ] Persona Natural [X] Persona Juridica

SOLAZYME, INC
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa [ ] Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [X] Otra

Documento de Identificación [ ] C.C. [ ] C.E. [ ] NIT [X] Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	561 Eccles Avenue South San Francisco, CA94080 (US)	California
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
alvaro.correa@bakermckenzie.com	3762211	6341500

[ ] **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

Correa Ordoñez, Alvaro	79.143.366 Usaquén	20.281
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Av. 82 No. 10 62 Piso 5	561 Eccles Avenue South San Francisco, CA94080 (US)	California
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
alvaro.correa@bakermckenzie.com	3762211	6341500

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite:

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente No.	Expediente No. 9.149.183	Expediente No.
De:	No. de divisionales 1	Expediente No.
A:		

5. Comprobante de Pago No 1315974 **Fecha** 18 / 2 / 2013

6. Anexos

x	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
x	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
x	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
x	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

Alvaro Correa Ordoñez
Nombre y apellidos

Firma

79.143.366 Usaquén
C.C.

20.281
Tarjeta Profesional

REIVINDICACIONES SOLICITUD
DIVISIONAL No. 09.149.183

1. Un método para producir un lípido, que comprende:

(a) Cultivar una población de microalgas bajo condiciones heterotróficas en un medio de cultivo que comprende material celulósico despolimerizado como una fuente de carbón primario hasta que las microalgas acumulen 60% o más de su peso de células secas como lípido; y
(b) Separar el lípido de las microalgas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el material celulósico despolimerizado comprende xilosa.

3. El método de la reivindicación 2, en donde las microalgas están caracterizadas por un nivel mayor de producción de lípidos en la etapa de cultivar que cuando se cultivan en solo glucosa.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el material celulósico despolimerizado comprende glucosa y xilosa.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo es agénico.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el material celulósico despolimerizado es uno o más materiales seleccionados del grupo que consiste de bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de arroz, pulpa de remolacha de azúcar, pulpa de cítricos, cáscaras de cítricos, clareos de madera, clareos de coníferas, virutas de madera, aserrín, desechos de molienda de pulpa, desechos de papel urbano, recortes de césped, pasto varilla, madera de álamo híbrido, miscanto, fibra de caña, y fibra de sorgo.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el material celulósico despolimerizado es bagazo de caña.

8. El método de la reivindicación 6, en donde el material celulósico despolimerizado es fibra de maíz.

9. El método de la reivindicación 6, en donde el material celulósico despolimerizado es miscanto.

10. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas son cultivadas bajo condiciones limitadas de nitrógeno.

11. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido comprende 50% o más de C18:1.

12. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido comprende 3% o más de C18:0 y 8% o más de C16:0.

13. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas acumulan 65% o más de su peso de células secas como lípido.

14. El método de la reivindicación 13, en donde las microalgas acumulan 70% o más de su peso de células secas como lípido.

15. El método de la reivindicación 1, en donde separar el lípido de las microalgas comprende lisar las microalgas y recuperar el lípido usando un solvente orgánico.

16. El método de la reivindicación 15, en donde el solvente orgánico es hexano.

17. El método de la reivindicación 1, que comprende además tratar el material celulósico con una enzima produciendo así el material celulósico despolimerizado del medio de cultivo.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde las microalgas se seleccionan del grupo que consiste de *Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Bracteococcus minor, Bracteococcus medionucleatus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora (cepa SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella ovalis, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (incluyendo cualquiera de las cepas UTEX 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata,*

Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta, Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEX LB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp., Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, Parachlorella kessleri, Pascheria acidophila, Pavlova sp., Phagus, Phormidium, Platymonas sp., Pleurochrysis carterae, Pleurochrysis dentate, Pleurochrysis sp., Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis, Prototheca zopfii, Pseudochlorella aquatica, Pyramimonas sp., Pyrobotrys, Rhodococcus opacus, Sarcinoid chrysophyte, Scenedesmus armatus, Schizochytrium, Spirogyra, Spirulina platensis, Stichococcus sp., Synechococcus sp., Tetraedron, Tetraselmis sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii, y *Viridiella fridericiana.*

19. El método de la reivindicación 18, en donde las microalgas son del gen *Chlorella* o *Prototheca*.

20. El método de la reivindicación 19, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides.*

21. El método de la reivindicación 19, en donde las microalgas son *prototheca moriformis.*

22. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de cultivar se lleva a cabo en la ausencia de luz.

23. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas son heterótrofas obligadas.

24. Un lípido producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

24

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0020889

Bogotá D.C., Marzo 01 de 2013 - 09:20:19

RECIBIDO DE : BAKER NI 900.532.339 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	7652	25/01/2013		30.000.00
RECIBO DE CA	999999999	15909	18/02/2013		990.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
34	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	1.020.000.00
				$1.020.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00006-0000
Fecha: 2013-03-01 16:12:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 24

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA ***RELACIÓN DE ANEXOS***	
Dependencia:	Fecha: _____/_____/_____/ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1			
2			
3			
4			
5			
6	12		
7			
8	09-149183-00		
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	***Soporte Documental***
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones: Anexan CD

Métodos y composiciones para la producción de aceites combustibles y oleoquímicos fabricados a partir de microorganismos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente revelación es concerniente con la producción de aceites, combustibles y oleoquímicos fabricados a partir de microorganismos. En particular, la revelación es concerniente con microorganismos portadores de aceite, en los que se incluyen microalgas, levaduras y hongos y con métodos para cultivar tales microorganismos para la producción de compuestos útiles, en los que se incluyen lípidos, ésteres de ácido graso, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos, para uso en la industria o como una fuente de energía o alimento.

Los microorganismos de la invención pueden ser seleccionados o diseñados genéticamente para uso en los métodos u otros aspectos de la invención descrita en la presente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El combustible fósil es un término general para depósitos geológicos combustibles enterrados de materiales orgánicos formados a partir de plantas y animales en decaimiento que han sido convertidos a aceptable crudo, carbón, gas natural o aceites pesados mediante exposición a calor y

presión en la corteza terrestre durante cientos de millones de años.

En el diálogo común, el combustible fósil, también conocido como combustible mineral, es usado como sinónimo con otros recursos naturales que contienen hidrocarburos tales como carbón, aceite y gas natural. La utilización de combustibles fósiles ha habilitado el desarrollo industrial a gran escala y suplantado extensamente los molinos impulsados por agua, también como la combustión de madera o ++++ torba para calentamiento. Los combustibles fósiles son un recurso no renovable finito.

Cuando se genera electricidad, la energía de la combustión de combustibles fósiles es frecuentemente usada para impulsar una turbina. Las generaciones más antiguas frecuentemente usaban vapor generado por el quemado de combustible para hacer girar la turbina, pero en las plantas de energía más nuevas, los gases producidos por el quemado del combustible hace girar una turbina de gas directamente. Con la modernización global en los siglos veinte y veintiuno, la sed de energía de combustibles fósiles, especialmente gasolina derivada de petróleo, es una de las causas de conflictos regionales y globales mayores.

El quemado de los combustibles fósiles por humanos es la fuente más grande de emisiones de dióxido de carbono, que es uno de los gases de invernadero que permiten el forzado

radioactivo y contribuyen al calentamiento global. En los Estados Unidos de América, más del 90% de las emisiones de gas de invernadero vienen de la combustión de combustibles fósiles. Además, otros contaminantes de aire, tales como óxido de nitrógeno, dióxido de azufre, compuestos orgánicos volátiles (VOC) y metales pesados son producidos.

La actividad humana eleva los niveles de gases de invernadero principalmente por la liberación de dióxido de carbono de la combustión del combustible fósil, pero otros gases, por ejemplo metano no son despreciables. Las concentraciones de varios gases de invernadero se ha incrementado con el paso del tiempo debido a actividades humanas tales como el quemado de combustibles fósiles y deforestación conduciendo a concentraciones más altas de dióxido de carbono. De acuerdo con la hipótesis de calentamiento global, los gases de invernadero de la industria y agricultura han jugado un papel principal en el calentamiento global observado recientemente.

La demanda incrementada por energía por la economía global también ha colocado presión incrementada sobre el costo de los hidrocarburos. Además de la energía, muchas industrias, en los que se incluyen fabricantes de plásticos y químicos, dependen fuertemente de la disponibilidad de hidrocarburos como materia prima para sus procesos de manufactura. Alternativas efectivas en el costo a las fuentes actuales de suministro

podrían ayudar a mitigar la presión ascendente sobre la energía y estos costos de materias primas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la presente invención proporciona un microbio, que en varias modalidades puede comprender una célula de microalgas, una levadura oleaginosa o un hongo que contiene un gen exógeno que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste de una lipasa, transportador de sacarosa, sacarosa invertasa, fructocinasa, enzima degradante de polisacárido, una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA aldehído reductasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa, un aldehído decarbonilasa grasa y una proteína portadora de acilo (ACP). El microbio (por ejemplo, célula de microalga) puede ser seleccionado por ejemplo de la Tabla 1. En modalidades particulares, la célula es una especie del género *Chlorella*, tal como por ejemplo *Chlorella fusca*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella ellipsoidea*. En otras modalidades, el microbio es una levadura oleaginosa seleccionada del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus terricolus*, *Candida sp.*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer*, *Endomycopsis vernalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, y *Yarrowia lipolytica*. En todavía otras modalidades,

el microbio es un hongo seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella*, *Mortierrla vinacea*, *Mortierella alpine*, *Pythium debaryanum*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Pennicillium iilacinum*, una especie del género *Hensenulo*, una especie del género *Chaetomium*, una especie del género *Cladosporium*, una especie del género *Malbranchea*, una especie del género *Rhizopus*, y una especie del género *Pythium*. En otras modalidades, la invención incluye la expresión de enzimas de modificación de hidrocarburos en huéspedes bacterianos tales como *E. coli* y *Bacilla* método para producir diesel renovable. En una modalidad, el método comprende: (a) cultivar una población de microorganismos en presencia de una fuente de carbono fija, en donde (i) los microorganismos acumulan por lo menos 10% de su peso celular seco como lípido y (ii) la fuente de carbono fija es seleccionada del grupo que consiste de glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarosa, melasas, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, fructosa, arabinosa, manosa, acetato y cualquier combinación de los anteriores, (b) aislar los componentes de lípido de los microorganismos cultivados y (c) someter los componentes de lípidos aislados a una o más reacciones químicas para generar alcanos de cadena recta, mediante lo cual se produce el diesel renovable.

En otro aspecto, la presente invención es

concerniente con una composición de hidrocarburos líquidos fabricados de acuerdo con el método descrito directamente anterior, en donde la composición se conforma a las especificaciones de ASTM D975.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para producir combustible de jet. En una modalidad, el método comprende (a) cultivar una población de microorganismos en presencia de una fuente de carbono fija, en donde (i) los microorganismos acumulan por lo menos 10% de su peso de célula seco como lípido y (ii) la fuente de carbono fija es seleccionada del grupo que consiste de glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarosa, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, fructosa, arabinosa, manosa, acetato y cualquier combinación de los anteriores, (b) aislar los componentes de lípido de los microorganismos cultivados, (c) someter a los componentes de lípidos aislados a una o más reacciones químicas para generar alcanos de cadena recta, (d) someter a pirólisis catalítica o cracking los alcanos de cadena recta, mediante lo cual se produce el combustible de jet.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una composición de hidrocarburos líquidos producidos de acuerdo con el método descrito directamente anterior, en donde la composición se conforma a las especificaciones de ASTM D 1655.

En otro aspecto, la presente invención es

concerniente con una microalga o célula de levadura que ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de ruta de lípido a un nivel alterado en comparación con una célula tipo silvestre de la misma especie. En algunos casos, la célula produce más lípido en comparación con la célula tipo silvestre cuando ambas células son cultivadas bajo las mismas condiciones. En algunos casos, la célula ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de ruta de lípido a un nivel más alto que la célula tipo silvestre. En algunos casos, la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de piruvato deshidrogenasa, acetilo-CoA carboxilasa, proteína portadora de acilo y glicerol-3 fosfato aciltransferasa. En algunos casos, la célula ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de ruta de lípido a un nivel más bajo que la célula tipo silvestre. En por lo menos una modalidad en la cual la célula expresa la enzima de ruta de lípido a un nivel más bajo, la enzima de ruta de lípido comprende citrato sintasa.

En algunas modalidades, la microalga o célula de levadura descrita anteriormente ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar un regulador global de síntesis de ácido graso a un nivel alterado en comparación con la célula tipo silvestre, mediante lo cual los niveles de expresión de una pluralidad de genes sintéticos de ácido graso son alterados en comparación con la célula tipo silvestre. En algunos casos,

la enzima de ruta de lípido comprende una enzima que modifica un ácido graso. En algunos casos, la enzima de ruta de lípido es seleccionada de una estearoil-ACP desaturasa y una glicerolípido desaturasa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un microbio que produce aceite que contiene uno o más genes exógenos, en donde los genes exógenos codifican proteína(s) seleccionada(s) del grupo que consiste de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa, un acil-CoA/aldehído reductasa grasa, un aldehído decarboxilasa grasa y una proteína portadora de acilo. En algunos casos, el microbio es *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea* o *Chlorella sp*. En otros casos, el microbio es de otra especie como se describe en la presente. En una modalidad, el gen exógeno está en enlace operable con un promotor, que es inducible o represible en respuesta a un estímulo. En algunos casos, el estímulo es seleccionado del grupo que consiste de una molécula pequeña provista exógenamente, calor, frío y luz. En algunos casos, el gen exógeno es expresado en un compartimiento celular. En algunas modalidades, el compartimiento celular es seleccionado del grupo que consiste de un cloroplasto y una mitocondria.

En una modalidad, el gen exógeno codifica una acil-ACP tioesterasa de ácido graso. En algunos casos, la

tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de una proteína portadora de acilo (ACP). En algunos casos, la tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 átomos de carbono de un ACP. En una modalidad, la tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 átomos de carbono de un ACP.

En una modalidad, el gen exógeno codifica una acil-CoA/aldehído reductasa grasa. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA de 20 a 30 átomos de carbono graso a alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 10 a 14 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente. En una modalidad, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 12 átomos de carbono a dodecanol.

En una modalidad, el gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente. En una modalidad, la reductasa codificada por el gen exógeno

cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 12 átomos de carbono a dodecanal.

En por lo menos una modalidad, el microbio de la invención contiene además uno o más genes de utilización de sacarosa exógenos.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un microbio que contiene dos genes exógenos, en donde un primer gen exógeno codifica una acil-ACP tioesterasa grasa y un segundo gen exógeno codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste de una acil-CoA reductasa grasa, una acil-CoA/aldehído reductasa grasa y una proteína portadora de acilo. En algunos casos, el microbio es *Chlorella minutissima*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.* o *Chlorella protothecoides*. En otros casos, el microbio es otra especie como se describe en la presente. En algunos casos, los dos genes exógenos están cada uno en enlace operable con un promotor, que es inducible en respuesta a un estímulo. En algunos casos, cada promotor es inducible en respuesta a un estímulo idéntico.

En una modalidad, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de un ACP. En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una acil-CoA/aldehído reductasa grasa que cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18

átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 átomos de carbono de un ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 10 a 14 átomos de carbono al alcohol primario correspondiente, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En una modalidad, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 átomos de carbono de un ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 12 átomos de carbono a dodecanol. En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa que cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente.

En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa y el microbio contiene además un tercer gen exógeno que codifica un aldehído descarbonilasa grasa. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de un ACP, la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído graso correspondiente y la descarbonilasa codificada por el

tercer gen exógeno cataliza la conversión de un aldehído graso de 8 a 18 átomos de carbono a un alcano correspondiente, en donde la tioesterasa, la reductasa y la descarbonilasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbonos.

En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa.

En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo y el microbio contiene además un tercer gen exógeno que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste de una acil-CoA reductasa grasa y una acil-CoA/aldehído reductasa grasa. En algunos casos, el tercer gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa y el microbio contiene además un cuarto gen exógeno que codifica un aldehído descarbonilasa grasa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para producir una molécula en una población de microbios. En una modalidad, el método comprende cultivar una población de microbios en un medio de cultivo, en donde los microbios contienen (i) un primer gen exógeno que codifica una acil-ACP tioesterasa grasa y (ii) un segundo gen exógeno que codifica una acil-CoA/aldehído reductasa grasa y los microbios sintetizan un ácido graso enlazado a una proteína portadora de acilo (ACP), la acil-ACP tioesterasa grasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP para producir,

por medio de procesamiento adicional, un acil-CoA graso y la acil-CoA/aldehído reductasa grasa cataliza la reducción del acil-CoA a un alcohol.

En una modalidad el método para producir una molécula en una población de microbios, el microbio es Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp. o Chlorella protothecoides. En otros casos, el microbio es otra especie de microorganismo como se describe en la presente. En algunos casos, el medio de cultivo contiene glicerol. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación. En algunos casos, el medio de cultivo contiene glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fijo. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono fijo es sacarosa. En algunos casos, todo el glicerol y todo de la otra fuente de carbono fija son provistos a los microbios al comienzo de la fermentación. En algunos casos, el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son alimentados a los microbios a una velocidad predeterminada en el curso de la fermentación. En algunos métodos de cultivo de la invención, el glicerol es provisto a los microbios en ausencia de la por lo menos otra fuente de carbono fijo por un primer período de tiempo, la por lo menos otra fuente de carbono fijo es provista al final del primer período de tiempo y los microbios son cultivados por un segundo período de tiempo en presencia de la

por lo menos otra fuente de carbono fijo.

En algunas modalidades, los genes exógenos están en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo. En algunos casos, el método comprende además proveer el primer estímulo e incubar la población de microbios por un primer período de tiempo en presencia del primer estímulo para producir un alcohol. En algunos casos, el método comprende además extraer el alcohol de biomasa acuosa que comprende el medio de cultivo y los microbios.

En algunas modalidades, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de la ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 átomos de carbono de la ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 10 a 14 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En una modalidad, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 átomos de carbono de la ACP y la reductasa

codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 12 átomos de carbono a dodecanol. En algunos casos, los microbios contienen además un tercer gen exógeno que codifica una proteína portadora de acilo. En algunas modalidades, el tercer gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para producir una molécula de lípido en una población de microbios. En una modalidad, el método comprende cultivar una población de microbios en un medio de cultivo, en donde los microbios contienen (i) un primer gen exógeno que codifica una acil-ACP tioesterasa grasa y (ii) un segundo gen exógeno que codifica una acil-CoA reductasa grasa y en donde los microbios sintetizan un ácido graso enlazado a una proteína portadora de acilo (ACP), la acil-ACP tioesterasa grasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP para producir, por medio de procesamiento adicional, un acil-CoA graso y la acil-CoA reductasa grasa cataliza la reducción del acil-CoA a un aldehído. En algunos casos, el microbio es Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp., o Chlorella protothecoides. En otros casos, el microbio es otra especie de microorganismo como se describe en la presente.

En algunas modalidades, los genes exógenos están en

enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y el método comprende además proveer el primer estímulo e incubar la población de microbios por un primer período de tiempo en presencia del primer estímulo para producir un aldehído. En una modalidad, el método comprende además extraer el aldehído de biomasa acuosa que comprende el medio de cultivo y la población de microbios.

En algunas modalidades, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de la ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En algunos casos, los microbios contienen además un tercer gen exógeno que codifica una aldehído descarbonilasa grasa que cataliza la conversión del aldehído a un alcano.

En algunos casos, los genes exógenos están en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y el método comprende además proveer el primer estímulo e incubar la población de microbios por un primer período de tiempo en presencia del primer estímulo para producir un alcano. En algunos casos, el método comprende además extraer el alcano de biomasa acuosa que comprende el medio de cultivo y la población de microbios.

En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de la ACP, reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente y la descarbonilasa codificada por el tercer gen exógeno cataliza la conversión de un aldehído de 8 a 18 átomos de carbono a un alcano correspondiente, en donde la tioesterasa, la reductasa y la descarbonilasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En algunas modalidades, los microbios contienen además un tercer gen exógeno que codifica una proteína portadora de acilo. En algunos casos, el tercer gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa. En algunos casos, los microbios contienen además un cuarto gen exógeno que codifica un aldehído descarbonilasa grasa que cataliza la conversión del aldehído a un alcano.

En algunos métodos, el medio de cultivo contiene glicerol. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación. En algunos casos, el medio de cultivo contiene glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fijo. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono fijo es sacarosa. En algunos casos, todo del glicerol y todo de la por lo menos otra fuente de carbono fija son provistos a los microbios al comienzo de la

fermentación. En algunos casos, el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son alimentados a los microbios a una velocidad predeterminada en el curso de la fermentación. En una modalidad, el glicerol es provisto a los microbios en ausencia de la por lo menos otra fuente de carbono fijo por un primer período de tiempo, la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al final del primer período de tiempo y los microbios son cultivados por un segundo período de tiempo en presencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para producir una molécula de ácido graso que tiene una longitud de cadena de carbono específica en una población de microbios. En una modalidad, el método comprende cultivar una población de microbios productores de lípidos en un medio de cultivo, en donde los microbios contienen un gen exógeno que codifican una acil-ACP tioesterasa grasa que tiene una actividad especifica a una longitud de cadena de carbonos y en donde los microbios sintetizan un ácido graso enlazado a una proteína portadora de acilo (ACP) y la tioesterasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP, cuando el ácido graso ha sido sintetizado a la longitud de cadena de carbono específica. En algunos casos, el microbio es Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp., o Chlorella protothecoides. En otros casos, el microbio es otra especie de

microorganismo como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el gen exógeno está en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y el método comprende además proveer el primer estímulo e incubar la población de microbios por un período de tiempo en presencia del primer estímulo. En algunos casos, el método comprende además extraer el ácido graso de biomasa acuosa que comprende el medio de cultivo y la población de microbios.

En algunos casos, los microbios contienen además un segundo gen exógeno que codifica una proteína portadora de acilo. En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa. En una modalidad, la acil-ACP tioesterasa cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de la ACP.

En algunos casos, el medio de cultivo contiene glicerol. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación. En algunas modalidades, el medio de cultivo contiene glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fija. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono es sacarosa. En algunos casos, todo del glicerol y todo de la por lo menos otra fuente de carbono fija son provistos a los microbios al comienzo de la fermentación. En algunos casos, el glicerol y la por lo menos

otra fuente de carbono fija son alimentados a los microbios a una velocidad predeterminada en el curso de la fermentación. En una modalidad, el glicerol es provisto a los microbios en ausencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija por un primer período de tiempo, la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al final del primer período de tiempo y los microbios son cultivados por un segundo período de tiempo en presencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una célula de microalga que contiene un gen exógeno, en donde el gen exógeno codifica una proteína seleccionada del grupo de una lipasa, un transportador de sacarosa, una invertasa sacarosa, una fructosinasa o una enzima polisacárido-degradante. En algunos casos, la célula es Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp., o Chlorella protothecoides. En otros casos, la célula es otra especie de microalga como se describe en la presente.

En algunos casos, el gen exógeno está en enlace operable con un promotor. En algunos casos, el promotor es inducible o represible en respuesta a un estímulo. En varias modalidades, el estímulo es seleccionado del grupo que consiste de una molécula pequeña provista exógenamente, calor, frío y luz. En algunos casos, el gen exógeno es expresado en un compartimiento celular. En algunas modalidades, el

compartimiento celular es seleccionado del grupo que consiste de un cloroplasto y una mitocondria.

En algunos casos, el gen codifica una lipasa que tiene por lo menos 70% de identidad de aminoácidos con una lipasa seleccionada de la tabla 9. En una modalidad, la lipasa es novozim-435. En una modalidad, la enzima polisacárido-degradante es endógena a un virus de Chlorella.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una célula de microalga que contiene dos genes exógenos, en donde un primer gen exógeno codifica una lipasa y un segundo gen exógeno codifica una enzima polisacárido-degradante. En algunos casos, los genes exógenos están cada uno en enlace operable con un promotor. En algunos casos, los genes exógenos están cada uno en enlace operable con promotores que son inducibles en respuesta a un estímulo. En algunos casos, los genes exógenos están cada uno en enlace operable con promotores que son inducibles en respuesta al mismo estímulo. En algunos casos, los genes exógenos están cada uno en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a por lo menos un estímulo que no induce el otro promotor.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para la manufactura de una molécula de lípido en un microbio. En una modalidad, el método comprende (a) cultivar el microbio por un primer período de tiempo suficiente para incrementar la densidad celular, en donde el

microbio contiene (i) un gen exógeno que codifica una lipasa y/o (ii) un gen exógeno que codifica una enzima polisacárido-degradante, en donde el (los) gen(es) exógeno(s) está(n) en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un estímulo, (b) proveer el estímulo y (c) incubar el microbio por un segundo período de tiempo en presencia del estímulo.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para la manufactura de una molécula de lípido en un microbio. En una modalidad, el método comprende (a) cultivar un microbio que produce lípido por un primer período de tiempo suficiente para incrementar la densidad celular, (b) proveer un virus capaz de infectar y someter a lisis el microbio cuando está en contacto directo con el microbio y (c) incubar el microbio por un segundo período de tiempo para producir biomasa acuosa sometida a lisis. En una modalidad, el método comprende además extraer moléculas de lípido de la biomasa acuosa sometida a lisis.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una célula de microalga que contiene un gen exógeno, en donde el gen exógeno codifica un co-factor para una enzima de ruta de lípido o codifica una proteína que participa en la síntesis del co-factor.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para cultivar un microbio que produce lípido. En una modalidad, el método comprende cultivar

el microbio en presencia de una cantidad suficiente de uno o más co-factores para una enzima de ruta de lípido para incrementar el rendimiento de lípido microbiano con respecto al rendimiento de lípido microbiano en ausencia del uno o más co-factores. En algunos casos, el uno o más co-factores consisten de una vitamina requerida por una o más enzimas de ruta de lípido. En una modalidad, el uno o más co-factores es biotina. En algunos casos, el uno o más co-factores son provistos al incluir en el cultivo un microbio que ha sido diseñado genéticamente para producir el uno o más co-factores.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para fermentar un microorganismo, que comprende proveer una mezcla que comprende glucosa y xilosa como fuente de energía al microorganismo. En una modalidad, la mezcla comprende además lignina. En una modalidad, la mezcla comprende además por lo menos una especie de furfural. En algunos casos, la mezcla es material celulósico despolimerizado. En algunos casos, la mezcla comprende además por lo menos una enzima de utilización de sacarosa. En una modalidad, la mezcla comprende una invertasa sacarosa.

En algunos casos, el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de Bracteococcus minor, Chlorella ellipsoidea, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Bracteococcus medionucleatus, Chlorella minutissima, Chlorella ovalis, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila,

Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella vulgaris, Parachlorella kessleri, Prototheca moriformis, y Pseudochlorella aquatica. En otros casos, el microorganismo es otra especie de microorganismo como se describe en la presente. En algunos casos, el microorganismo ha sido diseñado genéticamente para expresar un gen exógeno que codifica por lo menos una enzima de modificación de lípidos, enzima de modificación de hidrocarbonos o enzima de utilización de sacarosa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para cultivar una microalga, que comprende cultivar la microalga en un medio de cultivo que incluye una materia prima de alimentación que comprende por lo menos un sustrato de carbono seleccionado del grupo que consiste de un material celulósico, un azúcar de 5 átomos de carbono, un azúcar de 6 átomos de carbono y un acetato. En algunos casos, el sustrato de carbono es glucosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Parachlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus, Prototheca y Scenedesmus. En algunos casos, el sustrato de carbono es xilosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Pseudochlorella, y Prototheca. En algunos casos, el sustrato de carbono es sacarosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, and Bracteococcus. En algunos casos,

el sustrato de carbono es fructosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Parachlorella, Prototheca, y Scenedesmus. En algunos casos, el sustrato de carbono es arabinosa y la microalga es Chlorella sp. En algunos casos, el sustrato de carbono es manosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Parachlorella, Bracteococcus, Prototheca, y Scenedesmus. En algunos casos, el sustrato de carbono es galactosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Bracteococcus, Parachlorella, , Chlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus, y Prototheca. En algunos casos, el sustrato de carbono es acetato y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Parachlorella, y Prototheca.

En una modalidad, el medio de cultivo incluye además por lo menos una enzima de utilización de sacarosa. En algunos casos, la microalga ha sido diseñada genéticamente para expresar un gen exógeno que codifica por lo menos una enzima de modificación de lípidos, enzima de modificación de hidrocarbonos o enzima de modificación de sacarosa. En algunos casos, el medio de cultivo incluye una invertasa sacarosa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para el cultivo de microalga que comprende colocar una pluralidad de células de microalgas en presencia de material celulósico despolimerizado. En algunos

casos, las microalgas son cultivadas en presencia de una fuente de carbono fija adicional seleccionada del grupo que consiste de glicerol, sacarosa, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, fructosa, arabinosa, manosa, acetato y cualquier combinación de las anteriores. En una modalidad, las microalgas son cultivadas en presencia de por lo menos una enzima de utilización de sacarosa.

En algunos casos, las microalgas son seleccionadas de una especie del género Bracteococcus, una especie del género Chlorella, una especie del género Parachlorella, una especie del género Prototheca, o una especie del género Pseudochlorella. En algunos casos, la microalga es seleccionada de Bracteococcus minor, Chlorella ellipsoidea, Chlorella kessleń, Chlorella luteoviridis, Bracteococcus medionucleatus, Chlorella minutissima, Chlorella ovalis, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella vulgaris, Parachlorella kessleri, Prototheca moriformis, y Pseudochlorella aquatica. En otros casos, la microalga es otra especie de microalga como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la microalga ha sido diseñada genéticamente para expresar un gen exógeno que codifica por lo menos una enzima de modificación de lípidos, enzima de modificación de hidrocarbonos o enzima de modificación de sacarosa. En una modalidad, la por lo menos una enzima de

utilización de sacarosa es una invertasa sacarosa. En algunos casos, la por lo menos una enzima de modificación de lípidos es seleccionada de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, un acetil-CoA carboxilasa y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa. En algunos casos, la por lo menos una enzima de modificación de hidrocarbonos es seleccionada de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, una aldehído reductasa grasa, una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, un aldehído descarboxilasa grasa y una proteína portadora de acilo.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para cultivar un microbio que produce lípido, el método comprende cultivar el microbio en presencia de ácido acético y en ausencia de una fuente de nitrógeno fija. En algunos casos, el microbio es cultivado en presencia de una cantidad suficiente de ácido acético para incrementar el rendimiento de lípido microbiano con respecto al rendimiento de lípido microbiano en ausencia de ácido acético, en donde las condiciones de cultivo son de otra manera las mismas entre los dos cultivos.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un cultivo microbiano que contiene una población de microorganismos y un medio de cultivo que comprende glucosa, xilosa y una molécula seleccionada del grupo que consiste de lignina y una especie de furfural. En algunos

casos, los microorganismos son seleccionados de *Bracteococcus minor, Chlorella ellipsoidea, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Bracteococcus medionucleatus, Chlorella minutissima, Chlorella ovalis, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella vulgaris, Parachlorella kessleri, Prototheca moriformis* y *Pseudochlorella aquatica*. En otros casos, los microorganismos son otra especie de microorganismos como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para cultivar microalgas. En una modalidad, el método comprende a)proveer una célula de microalga apta de efectuar crecimiento heterotrófico, b) colocar la célula de microalga en medios de cultivo, en donde los medios de cultivo comprenden material celulósico despolimerizado y c)incubar la microalga por un periodo de tiempo suficiente para permitir que la célula crezca.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente, con un método de manufactura de biodiesel. En una modalidad, el método comprende a) cultivar un microorganismo que produce lípido en un primer cultivo microbiano, b) recuperar el lípido de la biomasa producida por el primer cultivo microbiano, c)someter el lípido a transesterificación para producir éster (s) de ácido graso y glicerol y d)agregar el glicerol a un segundo cultivo microbiano. En algunos casos,

los primeros y segundos cultivos microbianos son cultivos de la misma especie de microorganismos. En algunos caso, el segundo cultivo microbiano comprende microorganismo seleccionado del grupo que consiste de *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* y *Chlorella sorokiniana.* En otros casos, el segundo cultivo microbiano comprende otra especie de microorganismo como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método de fermentación que comprende el cultivo de un microorganismo en presencia de glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fija. En algunos casos el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son productos al microorganismo simultáneamente a una proporción predeterminada. En algunos casos, todo el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son provistos al microorganismo al comienzo de la fermentación. En algunos casos, todo el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son alimentados al microorganismo a una velocidad predeterminada durante el curso de la fermentación. En una modalidad del método, se provee glicerol al microorganismo en ausencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija por un primer periodo de tiempo, la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al final del primer periodo de tiempo y el microorganismo es

cultivado por un segundo periodo de tiempo en presencia de por lo menos otra fuente de carbono fija. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono fija es alimentada al microorganismo a una velocidad predeterminada durante el segundo periodo de tiempo. En algunos casos, todo de la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al microorganismo al final del primer periodo de tiempo. En una modalidad del método, la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al microorganismo en ausencia de glicerol por un primer periodo de tiempo, el glicerol es provisto al final del primer periodo de tiempo y el microorganismo es cultivado por un segundo periodo de tiempo en presencia de glicerol. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación. En una modalidad, el glicerol es acidulado. En otra modalidad, el glicerol no es acidulado. En algunos casos, la por lo menos otra fuente de carbono fija es glucosa. En algunos casos, la por lo menos otra fuente de carbono fija es material celulósico despolimerizado. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono fija es sacarosa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un fermentador que comprende una población de microorganismos, glicerol y por lo menos un azúcar seleccionado del grupo que comprende de xilosa, glucosa y sacarosa. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso

de transesterificación de lípido. En algunos casos, los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* y *Chlorella sorokiniana.* En otros casos, los microorganismos son otra especie como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para la fermentación de un microorganismo. En una modalidad, el método comprende proveer producto secundario de glicerol de un proceso de transesterificación como una sola fuente de energía de carbono fijo. En una modalidad, no se proporciona energía de luz al microorganismo. En otra modalidad, se proporciona energía de luz al microorganismo. En algunos casos, el microorganismo es seleccionado de *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* y *Chlorella sorokiniana.* En otros casos, el microorganismo es otra especie como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un microorganismo que contiene un gen de utilización de sacarosa exógeno. En una modalidad, el gen codifica un transportador de sacarosa. En una modalidad, el gen codifica una invertasa sacarosa. En una modalidad, el gen

codifica una fructocinasa. En algunos casos, el microorganismo es una especia seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellepsoidea, Chlorella sp. y Chlorella protothecoides*. En otros casos, el microorganismo es otra especie como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una célula de la especia *Chlorella protothecoides, Chlorella emersonii* o *Chlorella minutissima,* en donde la célula contiene un gen exógeno. En algunos casos, el gen exógeno codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste de un transportador de sacarosa, una invertasa sacarosa, una enzima de modificación de lípido, una enzima de modificación de hidrocarburo y una fructocinasa. En algunas modalidades, la proteína es una invertasa sacarosa secretada al espacio extracelular. En algunas modalidades, la proteína es una invertasa sacarosa apuntada al citoplasma.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un cultivo microbiano que contiene una población de microorganismos y un medio de cultivo que comprende i) sacarosa y ii) una enzima de invertasa sacarosa.

En otro aspecto, la presente inversión es concerniente con un cultivo microbiano que contiene una población de microorganismos y un medio de cultivo que comprende i) melasas y ii) una enzima de invertasa sacarosa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un cultivo microbiano que contiene una población de microorganismos y un medio de cultivo que comprende i) sacarosa, ii) lignina y iii) una enzima de invertasa sacarosa.

En los varios cultivos microbianos descritos anteriormente, los microorganismos contienen por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno. En algunas modalidades, el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa y una fructocinasa. En una modalidad, la enzima invertasa sacarosa es una enzima de invertasa sacarosa secretable codificada por un gen de invertasa sacarosa exógeno expresado por la población de microorganismos. En algunos casos, los microorganismos contienen por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido o una enzima de modificación de hidrocarburo.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un ácido nucléico que comprende un cADN que codifica un gen de utilización de sacarosa y un cADN que codifica una proteína que confiere resistencia al antibiótico higromicina o el antibiótico G418.

En modalidades de los varios métodos, composiciones, células, microorganismos, microbios, cultivos microbianos, fermentadores y los semejantes, descritos anteriormente, el

microorganismo o microbio puede ser una microalga, una levadura oleaginosa, un hongo o una bacteria, a no ser que se especifique de otra manera. En algunos casos, el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la tabla 1. En algunos casos, el microorganismo es una especie del género *Chlorella*. En algunos casos, el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de *Chlorella anitrata, Chlorella antárctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. Vacuolata, Chlorella glocotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusioum var Actophila, Chlorella infusioum var. Auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. Aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothercoides, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. Minima, Chlorella regularis var. Umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vannielli, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var airidis, Chlorella*

vulgaris var vulgaris, Chlorella vulgaris var vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var vulgaris f. viridis, Chlorella xantella y Chlorella zofingiensis. En algunos casos, el microorganismo es una levadura oleaginosa seleccionada del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces satarkeyi lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis y Yarrowia lipolytica.* En algunos casos, el microorganismo es un hongo seleccionada del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella, Mortierella vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus achraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacium,* una especie del género *Hansenulo,* una especie del género *Chaetomium,* una especie del género *Cladosporium,* una especie del género *Malbranchea,* una especie de género *Rhizopus* y una especie del género *Pythium.*

En las varias modalidades descritas anteriormente, el microorganismo puede contener por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno. En algunos casos, el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa o una fructocinasa.

En las varias modalidades descritas anteriormente, el microorganismo puede contener por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido. En algunos casos, la

enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de una esteaoril-ACP desaturasa, un glicerolípido desaturasa, un piruvato deshidrogenasa, una acetil- CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3-fosfatoaciltransferasa.

En las varias modalidades descritas anteriormente, el microorganismo puede contener por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de modificación de hidrocarburo. En algunos casos, la enzima de modificación de hidrocarburo es seleccionada del grupo que consiste de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil- CoA/aldehído reductasa grasa, una acil- CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa, un aldehído descarbonilasa grasa y/o una proteína portadora de acilo.

Cualquiera de dos o más de las varias modalidades descritas anteriormente pueden ser combinadas conjuntamente para producir modalidades adicionales abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

BREVE DEESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra el peso de células seco por litro de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con y sin glucosa adicional.

La figura 2 muestra el peso de células seco por litro de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son

cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional.

La figura 3 muestra las concentraciones de lípido relativas de cultivo de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional.

La figura 4 muestra la concentración de lípido de cultivo de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivados en presencia de varios tipos de glicerol con y sin glucosa adicional.

La figura 5 muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de dos especies y cepa de *Chlorella* cuando son cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional, en donde el glicerol es agregado secuencialmente después de glucosa.

La figura 6 muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de dos especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivados en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional.

La figura 7 muestra la concentración de lípido relativa de cultivos de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivados en presencia de glucosa al 2% y glucosa al 1% más glicerol grado reactivo al 1%.

La figura 8 muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de múltiples especies y cepas de *Chlorella*

cuando son cultivadas en presencia de glucosa con y sin glicerol grado reactivo, en donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

La figura 9 muestra la concentración de lípido relativa de cultivos de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivados en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional, en donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

La figura 10 muestra el peso de célula seca por litro de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional, en donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

La figura 11 (a) muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de *Spirulina platensis* cuando es cultivada en presencia de glucosa, glicerol grado reactivo, producto secundario de glicerol de biodiesel sin acidular y una combinación de glicerol y glucosa.

La figura 11 (b) muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de *Navicula pelliculosa* cuando es cultivada en presencia de varios tipos de glicerol en presencia de combinaciones de glicerol y glucosa.

La figura 12 (a) muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de *Scenedesmus armatus* cuando es cultivado en presencia de varios tipos de glicerol y en presencia de una

combinación de glicerol y glucosa.

La figura 12 (b) muestra el peso de célula seca por litro de *Scenedesmus armatus* cuando es cultivado en presencia de varios tipos de glicerol y en presencia de una combinación de glicerol, producto secundario de biodiesel y glucosa.

La figura 13 muestra el peso seco de célula por litro de *Navicula pelliculosa* cuando es cultivada en presencia de varios tipos de glicerol y en presencia de una combinación de glicerol, producto secundario de biodiesel sin acidular y glucosa.

La figura 14 muestra el peso de célula seca por litro de *Scenedesmus armatus* y *Navicula pelliculosa* cuando son cultivados en presencia de glicerol, producto secundario de biodisel acidulado y sin acidular con glucosa adicional, en donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

La figura 15 muestra un efecto sinergístico con la combinación de xilosa y glucosa sobre el crecimiento de *Chlorella* en comparación con xilosa o glucosa solos.

La figura 16 muestra el genotipo de transformante de *Chlorella protothecoides* que contiene un gen exógeno.

La figura 17 muestra el uso de codón de *Chlorella protothecoides*.

La figura 18 muestra el uso de codón de *D. salina* y *Chlorella pyrenoidosa*.

La figura 19 muestra a) glicerol grado reactivo; b) glicerol producto secundario de biodiesel sin acidular y c) glicerol producto secundario de diesel acidulado, todos los cuales fueron usados en los experimentos descritos en los ejemplos.

La figura 20 muestra el cultivo de *Chlorella protothecoides* sobre glucosa y fructosa.

La figura 21 muestra el cultivo de *Chlorella fusca* sobre sacarosa al 1%.

La figura 22 muestra el cultivo de *Chlorella kessleri* sobre sacarosa al 1%.

La figura 23 muestra el peso seco de célula por litro de *Chlorella protothecoides* cuando es cultivada en presencia de glucosa, sacarosa o una de varias muestras de melasa (designadas BS1, BS2 y HTM) en presencia o ausencia de una invertasa de sacarosa.

La figura 24 muestra el cultivo de *Chlorella protothecoides* cuando es cultivado en presencia de glucosa, sacarosa o una de varias muestras de melasa (designadas BS1, BS2 y HTM) en presencia o ausencia de una invertasa de sacarosa tal como es medida por la densidad celular relativa.

La figura 25 muestra una imitación de varios conceptos de plásmido de invertasa de levadura (SUC2) con tres diferentes promotores (designados CMV, CV y HUP1) también como sitios de restricción útiles para la sub-clonación.

La figura 26 muestra el genotipo de transformantes de *Chlorella protothecoides* seleccionados sobre sacarosa en la obscuridad que contiene un gen de invertasa sacarosa exógeno.

La figura 27 muestra el genotipo células de *Chlorella protothecoides* transformadas con un gen que codifica una invertasa de sacarosa secretada de *S. cerevisiae*.

La figura 28 muestra el genotipo células de *Chlorella minutissima y Chlorella emersonii* transformadas con un gen que codifica una invertasa de sacarosa secretada de *S. cerevisiae*.

La figura 29 ilustra un cromatógrafo de gases generado mediante análisis de un producto de diesel renovable producido de acuerdo con los métodos de la presente invención de descrito en el ejemplo 27.

La figura 30 ilustra una gráfica de la distribución del punto de ebullición para un producto de diesel renovable producido de acuerdo con los métodos de la presente invención y descrito en el ejemplo 27.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

A no ser que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos mostrados en la presente tienen el significado entendido comúnmente por una persona experimentada en el arte con el cual la invención es concerniente. Las siguientes referencias proporcionan a aquel

de habilidad ordinaria una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton *et al., Dictionary of microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genectics, 5th Ed.*, R.Rieger *et al. (eds.)*, Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology (1991).* Como se usa en la presente los siguientes términos, tienen los significados adscritos a ellos a no ser que se especifique de otra manera.

Como se usa con referencia a un ácido nucléico, "activo en microalgas" se refiere e un ácido nucléico que es funcional en microalgas. Por ejemplo, un promotor que ha sido usado para impulsar un gen de resistencia a antibiótico a impartir resistencia a antibiótico a una microalga transgénica es activo en microalgas. Ejemplos de promotores activos en microalgas son promotores endógenos a ciertas especies de algas y promotores encontrados en virus de plantas.

Una "proteína portadora de acilo" o "ACP" es una proteína que se enlaza, a una cadena de acilo creciente durante la síntesis de acido graso como un tioléster en el tiol distante d la porción de 4'-fosfopanteteína y comprende un componente del complejo de sintasa de acido graso. La frase "co-expresado naturalmente" con referencia a una proteína portadora de acilo en conjunción con una síntesis – ACP tioesterasa grasa significa que la ACP y la tioesterasa son co-

expresados naturalmente en un tejido u organismo del cual son derivados, por ejemplo debido a que los genes que codifican las dos enzimas están bajo el control de una secuencia regulatoria común o debido a que son expresados en respuesta al mismo estimulo.

Una "molécula de acil-CoA" o "acil-CoA" es una molécula que comprende una porción de acilo anexada covalentemente a la Co-enzima A por medio de un enlace de tioléster en el tiol distante de la porción e 4'-fosfopanteteína de la Co-enzima A.

"Axénico" significa un cultivo de un organismo que está libre de recombinación por otros organismos vivientes.

"Biodiesel" es un alquiléster de ácido graso producido biológicamente apropiado para uso como combustible en un motor a diesel.

El término "biomasa" se refiere al material producido mediante el cultivo y/o propagación de células. La biomasa puede contener células y/o contenido intracelular, también como material extracelular. El material extracelular incluye pero no está limitado a compuestos secretados por una célula.

"Biorreactor" significa un envolvente o envolvente parcial en el cual las células son cultivadas, opcionalmente en suspensión.

Como se usa en la presente, "catalizador" se refiere a un agente, tal como una molécula o complejo macromolecular,

apto de facilitar o promover una reacción química de un reactivo a un producto sin volverse parte del producto. Así, un catalizador incrementa la velocidad de una reacción, después de lo cual, el catalizador puede actuar sobre otro reactivo para formar el producto. Un catalizador disminuye en general la energía de activación global requerida para la reacción, de tal manera que procede más rápidamente o a una temperatura más baja. Así, un equilibrio de reacción se puede obtener más rápidamente. Ejemplos de catalizadores incluyen enzimas, que son catalizadores biológicos, calor, que es un catalizador no biológico y catalizadores de metal usado en procesos de refinación de petróleo fósil.

"Material celulósico" significa los productos de digestión de celulosa, en los que se incluye glucosa y xilosa, y opcionalmente compuestos adicionales tales como disacáridos, oligosacáridos, lignina, furfurales y otros compuestos. Ejemplos no limitantes de fuentes de material celulósico incluyen bagasas de caña de azúcar, pulpa de remolacha de azúcar, rastrojo de maíz, fragmentos de madera, aserrín y pasto varilla.

El término "co-cultivo" y variantes del mismo, tales como "co-cultivar", se refiere a la presencia de dos o más tipos de células en el mismo bioreactor. Los dos o más tipos de células pueden ambos ser microorganismos, tales como microalgas o pueden ser una célula de microalga cultivada con un diferente

tipo de célula. Las condiciones de cultivo pueden ser aquellas que refuerzan el crecimiento y/o propagación de los dos o más tipos de células o aquellos que facilitan el crecimiento y/o proliferación de una o un subconjunto, de las dos o más células, en tanto que mantienen el crecimiento celular para el resto.

El término "co-factor" es usado en la presente para referirse a cualquier molécula, diferente al sustrato, que es requerida para que una enzima lleve a cabo su actividad enzimática.

Como se usa en la presente, "ADN complementario" ("cADN") es una representación de ADN de mARN, obtenido usualmente mediante transcripción inversa de ARN mensajero (mARN) o amplificación (por ejemplo, vía reacción en cadena de polimerasa ("PCR")).

El término "cultivado" y variantes del mismo, se refieren al refuerzo no intencional del crecimiento (incrementos en tamaño de célula, contenido celular, y/o actividad celular) y/o propagación (incrementos en números de células vía mitosis) de una o más células mediante el uso de condiciones de cultivo propuestas. La combinación de tanto de cultivo como propagación puede ser denominada proliferación. La una o más células pueden ser aquellas de un microorganismo, tales como microalgas. Ejemplos de condiciones propuestas incluyen el uso de un medio definido (con características

conocidas tales como pH, fuerza iónica y fuente de carbono), temperatura especificada, tensión de oxígeno, niveles de dióxido de carbono y crecimiento en un bioreactor. El término no se refiere a crecimiento o propagación de microorganismos en la naturaleza o de otra manera sin intervención humana directa, tal como crecimiento natural de un organismo que finalmente se convierte en fósil para producir petróleo crudo geológico.

Como se usa en la presente, el término "citólisis" se refiere a la lisis de células en un medio ambiente hipotónico. La citólisis es provocada por osmosis excesiva o movimiento de agua, hacia el interior de una célula (hiperhidratación). La célula no puede soportar la presión osmótica del agua al interior y así explota.

Como se usa en la presente, los términos "vector de expresión" o "constructo de expresión" se refieren a un constructo de ácido nucleico, generado recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Comúnmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico a ser transcrito enlazado operativamente a un promotor.

"Gen exógeno" se refiere a un ácido nucleico transformado a una célula. Una célula transformada puede ser

denominada como célula recombinante, a la cual gen(es) exógeno(s) adicional(s) puede(n) ser introducido(s). El gen exógeno puede ser de una especie diferente (y así heterólogo) o de la misma especie (y así homólogo) en relación con la célula que es transformada. En el caso de un gen homólogo, ocupa a sitio diferente en el genoma de la célula en relación con la copia endógena del gen. El gen exógeno puede estar presente en más de una copia en la célula. El gen exógeno puede ser mantenido en una célula como una inserción al genoma o como una molécula episomal.

"Provisto exógenamente" describe una molécula provista al medio de cultivo de un cultivo celular.

Como se usa en la presente, una "acil-ACP tioesterasa grasa" es una enzima que cataliza la escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis del lípido.

Como se usa en la presente, una "acil-CoA/aldehído reductasa grasa" es una enzima que cataliza la reducción de una molécula de acil-CoA a un alcohol primario.

Como se usa en la presente, una "acil-CoA reductasa grasa" es una enzima que cataliza la reducción de una molécula de acil-CoA a un aldehído.

Como se usa en la presente, una "aldehído descarbonilasa grasa" es una enzima que cataliza la conversión de un aldehído graso a un alcano.

Como se usa en la presente, una "aldehído reductasa grasa" es una enzima que cataliza la reducción de un aldehído a un alcohol primario.

"Fuente de carbono fija" significa molécula(s) que contiene(n) carbono, preferiblemente orgánico, que está presente a la temperatura y presión ambiental en forma sólida o líquida.

"Hongo", como se usa en la presente, significa organismos heterotróficos caracterizados por una pared celular quitinosa del reino de hongos.

"Homogenado" significa biomasa que ha sido sometida a disrupción físicamente.

Como se usa en la presente, "hidrocarburo" se refiere a: (a) una molécula que contiene solamente átomos de hidrógeno y carbono, en donde los átomos de carbono están enlazados covalentemente para formar una cadena fundamental lineal, ramificada, típica o parcialmente típica a la cual los átomos de hidrógeno están unidos; o (b) una molécula que solo contiene principalmente átomos de hidrógeno y carbono y que puede ser convertida para contener solamente átomos de hidrógeno y carbono mediante una a cuatro reacciones químicas. Ejemplos no limitantes de los últimos incluyen hidrocarburos que contienen un átomo de oxígeno entre un átomo de carbono y un átomo de hidrógeno para formar una molécula de alcohol, también como aldehídos que contienen un solo átomo de oxígeno. Métodos para

la reducción de alcoholes a hidrocarburos que contienen solamente átomos de carbono e hidrógeno son bien conocidos. Otro ejemplo de un hidrocarburo es un éster, en el cual un grupo orgánico reemplaza un átomo de hidrógeno (o más de uno) en un oxígeno ácido. La estructura molecular de los compuestos de hidrocarburo varía de la forma más simple, en la forma de metano (CH_4), que es un constituyente de gas natural, a las muy pesadas muy complejas, tales como algunas moléculas tales como asfaltenos encontrados en petróleo crudo, petróleo y betunes. Los hidrocarburos pueden estar en forma gaseosa, líquida o sólida o cualesquier combinaciones de estas formas y pueden tener uno o más doble o triples enlaces entre átomos de carbono adyacentes en la cadena fundamental. Así, el término incluye alcanos lineales, ramificados, cíclicos o parcialmente cíclicos, alquenos, lípidos y parafina. Ejemplos incluyen propano, butano, pentano, hexano, octano, trioleína y escualeno.

"Enzima de modificación de hidrocarburo" se refiere a una enzima que altera la estructura covalente de un hidrocarburo. Ejemplos de enzimas de modificación de hidrocarburo incluyen una lipasa, una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa y un aldehído descarbonilasa grasa. Compuestos producidos por la actividad enzimática de enzimas de modificación de hidrocarburo, en los

que se incluyen ácidos grasos, alcoholes, aldehídos, alcanos y otros compuestos derivados de los mismos son denominados en la presente de manera intercambiable como hidrocarburos o lípidos.

El término "proporción de hidrógeno:carbono" se refiere a la proporción de átomos de hidrógeno a átomos de carbono en una molécula en base de átomo a átomo. La proporción puede ser usada para referirse al número de átomos de carbono e hidrógeno en una molécula de hidrocarburo. Por ejemplo, el hidrocarburo con la proporción más alta es metano CH_4 (4:1).

"Fracción hidrofóbica" se refiere a la porción o fracción, de un material que es más soluble en una fase hidrofóbica en comparación con una fase acuosa. Una fracción hidrofóbica es sustancialmente insoluble en agua y usualmente no polar.

Como se usa en la presente, la frase "incremento de rendimiento de lípido" se refiere a un incremento en la productividad de un cultivo microbiano al incrementar por ejemplo el peso seco de células por litro de cultivo, incrementar el porcentaje de células que constituyen el lípido o incrementar la cantidad global de lípido por litro de volumen de cultivo por tiempo unitario.

Un "promotor inducible" es uno que modera la transcripción de un gen enlazado operativamente en respuesta a un estímulo particular.

Como se usa en la presente, la frase "en enlace

operable" se refiere a un enlace funcional entre dos secuencias, tal como una secuencia de control (comúnmente un promotor) y la secuencia enlazada. Un promotor está en enlace operable con un gen exógeno si puede moderar la transcripción del gen.

El término "*in situ*" significa "en el lugar" o "en su posición original". Por ejemplo, un cultivo puede contener una primera microalga que segrega un catalizador y un segundo microorganismo que segrega un sustrato, en donde los primeros y segundos tipos de células producen los componentes necesarios para que una reacción química particular ocurra *in situ* en el co-cultivo sin requerir separación adicional o procesamiento de los materiales.

Una "concentración limitante de un nutriente" es una concentración en un cultivo que limita la propagación de un organismo cultivado. Una "concentración no limitante de un nutriente" es una concentración que soporta la propagación máxima durante un período de cultivo dado. Así, el número de células producida durante un período de cultivo dado es menor en presencia de una concentración limitante de un nutriente que cuando el nutriente es no limitante. Se dice que un nutriente está "en exceso" en un cultivo, cuando el nutriente está presente en una concentración mayor que aquella que soporta la propagación máxima.

Como se usa en la presente, una "lipasa" es una

enzima soluble en agua que cataliza la hidrólisis de enlaces de éster en sustratos lípidos insolubles en agua. Las lipasas catalizan la hidrólisis de lípidos a gliceroles y ácidos grasos.

Como se usa en la presente, una "enzima de ruta de lípido" es cualquier enzima que juega un papel en el metabolismo del lípido, esto es, ya sea en síntesis, modificación o degradación del lípido. Este término abarca proteínas que modifican químicamente lípidos, también como proteínas portadoras.

"Lípidos" son una clase de hidrocarburos que son solubles en solventes no polares (tales como éter y cloroformo) y son relativa o completamente insolubles en agua. Las moléculas de lípido tienen estas propiedades debido a que consisten extensamente de colas de hidrocarburo largas que son hidrofóbicas por la naturaleza. Ejemplos de lípidos incluyen ácidos grasos (saturados e insaturados); glicéridos o glicerolípidos (tales como monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos o grasas neutras y fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos); no glicéridos (esfingolípidos, esterol lípidos en los que se incluyen colesterol y hormonas esteroides, prenol lípidos en los que se incluyen terpenoides, alcoholes grasos, ceras y policétidos); y derivados de lípidos complejos (lípidos azúcar-enlazados o glicolípidos y lípidos proteína-enlazados). "Grasas" son un subgrupo de lípidos

llamados “triacilglicéridos”.

Como se usa en la presente, el término “lisado” se refiere a una solución que contiene el contenido de células sometidas a lisis.

Como se usa en la presente, el término “lisis” se refiere al rompimiento de la membrana celular y opcionalmente la pared celular de un organismo biológico suficiente para liberar por lo menos algo de contenido intracelular, frecuentemente mediante mecanismos mecánicos, virales u osmóticos que comprometen su integridad.

Como se usa en la presente, el término “someter a lisis” se refiere a la disrupción de la membrana celular y opcionalmente la pared celular de un organismo biológico o célula suficiente para liberar por lo menos algo de contenido intracelular.

“Microalga” significa un organismo microbiano eucariótico que contiene un cloroplasto y opcionalmente que es apto de efectuar fotosíntesis o un organismo microbiano procarióntico apto de efectuar fotosíntesis. Las microalgas incluyen fotoautótrofos obligados, que no pueden metabolizar una fuente de carbono fija como energía, también como heterótrofos, que pueden vivir solamente de una fuente de carbono fija. Las microalgas se pueden referir a organismos unicelulares que separan de células hermanas brevemente después de la división celular, tales como *Chlamydomonas* y puede

también referirse a microbios tales como por ejemplo, *Volvox*, que es un microbio fotosintético multicelular simple de dos tipos de células distintas. "Microalgas" también se pueden referir a células tales como *Chlorella* y *Dunaliella*. "Microalgas" también incluyen otro organismos fotosintéticos microbianos que exhiben adhesión de célula-célula, tales como *Agmenellum*, *Anabaena* y *Pyrobotrys*. "Microalgas" también incluyen microorganismos heterotróficos obligados que han perdido la habilidad de efectuar fotosíntesis, tales como ciertas especies de algas dinoflageladas.

Los términos "microorganismo" y "microbio" son usados intercambiablemente en la presente para referirse a organismos unicelulares microscópicos.

"Levadura oleaginosa", como se usa en la presente, significa levadura que puede acumular naturalmente más del 10% de su peso de célula seco como lípido y puede hacer esto como resultado de diseño genético. Levaduras oleaginosas incluyen organismos tales como *Yarrowia lipolytica*, también como cepas diseñadas de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae* que han sido diseñadas para acumular más del 10% de su peso seco de célula como lípidos.

Como se usa en la presente, el término "choque osmótico" se refiere a la ruptura de células en una solución enseguida de una reducción repentina de presión osmótica. El choque osmótico es inducido algunas veces a liberar componentes

celulares de tales células a una solución.

"Fotobioreactor" se refiere a un recipiente, por lo menos parte del cual es por lo menos parcialmente transparente o parcialmente abierto, permitiendo mediante esto que la luz pase a través del mismo, en el cual una o más células de microalgas son cultivadas. Los fotobioreactores pueden ser cerrados, como en el caso de una bolsa de polietileno o matraz Erlenmeyer o pueden ser abiertos al medio ambiente, como en el caso de una laguna a la intemperie.

Como se usa en la presente, una "enzima polisacárido-degradante" se refiere a cualquier enzima apta de catalizar la hidrólisis o despolimerización de cualquier polisacárido. Por ejemplo, las celulasas catalizan la hidrólisis de celulosa.

"Polisacáridos" (también llamados "glicanas") son carbohidratos compuestos de monosacáridos unidos conjuntamente mediante enlaces glicosídicos. La celulosa es un ejemplo de un polisacárido que compone ciertas paredes de células de planta. La celulosa puede ser despolimerizada mediante enzimas para producir monosacáridos tales como xilosa y glucosa, también como disacáridos y oligosacáridos más grandes.

"Compuerta", en el contexto de un bioreactor, se refiere a un orificio en el bioreactor que permite la afluencia o salida de materiales tales como gases, líquidos y células. Los puertos son conectados usualmente a tubería que conduce del fotobioreactor.

Un “promotor” es definido como un arreglo de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en la presente, un promotor incluye las secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de transcripción, tal como en el caso de un promotor tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos de mejorador o represor distantes, que pueden estar ubicados tanto como varios miles de pares de bases del sitio de inicio de transcripción.

Como se usa en la presente, el término “recombinante” cuando es usado con referencia por ejemplo a una célula o ácido nucleico, proteína o vector indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno o proteína o la alteración de un ácido nucleico natural o proteína o que la célula es derivada de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no son encontrados en la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que son de otra manera expresados anormalmente, sub-expresados o no expresados. El término “ácido nucleico recombinante” en la presente significa ácido nucleico, originalmente formado in Vitro, en general mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo utilizando polimerasas y endonucleasas en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza. De esta manera, se obtiene el

enlace operativo de diferentes secuencias. Así, un ácido nucleico aislado, en forma lineal o un vector de expresión formado in Vitro mediante irrigación de moléculas de ADN que no están normalmente unidas, son ambos considerados recombinantes para los propósitos de esta invención. Se comprenderá que una vez que un ácido nucleico recombinante es elaborado y reintroducido a una célula huésped u organismo, se replicará no recombinantemente, esto es utilizando la maquinaria celular in vivo de la célula huésped, en lugar de manipulaciones in Vitro; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos recombinantemente, aunque subsecuentemente resultados no recombinantemente, son todavía considerados recombinantes para los propósitos de la invención. Similarmente, una "proteína recombinante" es una proteína elaborada utilizando técnicas recombinantes, esto es, por medio de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se ilustra anteriormente.

Como se usa en la presente, el término "diesel renovable" se refiere a alcanos (tales como C: 10:0, C12:0, C:14:0, C16:0 y C18:0) producidos por medio de hidrogenación y desoxigenación de lípidos.

Como se usa en la presente, el término "sonificación" se refiere a un proceso para someter a disrupción materiales biológicos, tales como una célula, mediante el uso de energía de ondas de sonido.

"Especie de furfural" se refiere a 2-

furancarboxaldehído o un derivado del mismo que retiene las mismas características estructurales básicas.

Como se usa en la presente, "rastrojo" se refieren a estacas secas y hojas de una cosecha restante después que un grano ha sido cosechado.

Un "gen de utilización de sacarosa" es un gen que cuando es expresado, ayuda en la habilidad de una célula para utilizar sacarosa como fuente de energía. Las proteínas codificadas por un gen de utilización de sacarosa son denominadas en la presente como "enzimas de utilización de sacarosa" e incluyen transportadores de sacarosa, invertasas de sacarosa y exosinasas tales como glucosinasas y fructosinasas.

"Desperdicio de agua" es desperdicio acuoso que contiene comúnmente agua de lavado, desperdicio de lavandería, heces, orina y otros desperdicios líquidos o semilíquidos. Incluyen algunas formas de desperdicio municipal también como aguas cloacales tratadas secundariamente.

Por comparación de secuencias para determinar el porciento de identidad de nucleótidos o aminoácidos, comúnmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la cual las secuencias de prueba son comparadas. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia son introducidas a una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencia.

Luego, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porciento de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa designados.

Alineación óptima de secuencias por comparación se pueden llevar a cabo por ejemplo mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. MoI. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similaridad de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de éstos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de elementos de programación de Wisconsin Genetics, Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase en general Ausubel et al, supra).

Otro algoritmo ejemplar que es apropiado para determinar el porciento de identidad de secuencia y similaridad de secuencia es el algoritmo BLAST, que es descrito en Altschul et al, J. MoI. Biol. 215:403-410 (1990). Elementos de programación para efectuar análisis de BLAST están disponibles públicamente por medio del National Center for Biotechnology Information (en la dirección de web www.ncbi.nlm.nih.gov). Este algoritmo involucra identificar primero pares de secuencia de alta puntuación (HSPs) al identificar palabras cortas de

longitud W en la secuencia de interrogación, que ya sea coincide o satisface alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando son alineadas con una palabra de la misma longitud en la misma secuencia de base de datos. T es denominado como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al, supra.). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contienen. Los aciertos de palabras son extendidos en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por tanto como la puntuación de alineación acumulativa pueda ser incrementada. Las puntuaciones acumulativas son calculadas utilizando para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación hacia atrás para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalidad para residuos que no coinciden; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección son detenidas cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae por la cantidad X de su valor obtenido máximo; la puntuación acumulativa va a cero o menor debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuo de puntuación negativos o se llega ya sea a uno u otro del final de la secuencia. Para identificar si un ácido nucleico o polipéptido está dentro del alcance de la invención, los parámetros predeterminados de los programas de BLAST son

apropiados. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como predeterminado una longitud de palabra (W) del 3, una esperanza (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62. El programa TBLATN (utilizando secuencia de proteínas para secuencias de nucleótidos) utiliza como predeterminado una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10, y una matriz de puntuación BLOSUM 62.(véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. ScL USA 89:10915 (1989)).

Además de calcular el porciento de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también efectúa un análisis estadístico de la similaridad entre dos secuencias (por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similaridad provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se puede presentar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por probabilidad. Por ejemplo, un ácido nucleico es considerado similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0.1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0.01 y más

preferiblemente menos de aproximadamente 0.001.

II. GENERAL

La premisa de la invención está en parte en el concepto de que ciertos microorganismos pueden ser usados para producir aceites, combustibles y otras composiciones de hidrocarburos o lípidos económicamente y en grandes cantidades para uso en las industrias de combustible de transportación, industria petroquímica y/o de alimentos o cosméticos entre otras aplicaciones. Microorganismos apropiados incluyen microalgas, levadura oleaginosa y hongos. Un género preferido de microalgas para uso en la invención es la microalga que produce lípidos Chlorella. La transesterificación de lípidos produce ésteres de ácido graso de cadena larga útiles como biodiesel. Otros procesos enzimáticos y químicos pueden ser confeccionados para producir ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, alcanos y alquenos. La presente solicitud describe métodos para la modificación genética de múltiples especies y cepas de microorganismos, en los que se incluyen Chlorella y microbios similares para proveer organismos que tienen características que facilitan la producción de lípido apropiado para conversión a aceites, combustibles y oleoquímicos. En algunas aplicaciones, se producen diesel renovable, combustibles de jet u otros compuestos de hidrocarburos. La presente solicitud también describe métodos para cultivar microalgas para productividad incrementada y rendimiento de

lípido incrementado y/o para la producción más efectiva en el costo de las composiciones descritas en la presente.

En modalidades particulares, la presente solicitud describe cepas diseñadas genéticamente de microalgas con uno o más genes exógenos. Por ejemplo, microalgas que producen altos niveles de triacilglicéridos (TAG) apropiados para biodiesel pueden ser diseñados para expresar una lipasa, que puede facilitar la transesterificación de TAG de microalgas. La lipasa puede opcionalmente ser expresada utilizando un promotor inducible, de tal manera que las células pueden primero ser cultivadas a una densidad deseable en un fermentador y luego cosechadas, seguido por la inducción del promotor para expresar la lipasa, opcionalmente en presencia de alcohol suficiente para impulsar la conversión de TAG a ésteres de ácido graso.

Algo de lípido microalgal es secuestrado en las membranas celulares y otras partes no acuosas de la célula. Por consiguiente, para incrementar el rendimiento de la reacción de transesterificación, puede ser benéfico someter a lisis las células para incrementar el acceso de la lipasa al lípido. La disrupción celular puede ser efectuada, por ejemplo mecánicamente por medio de la adición de vapor presurizado o al emplear un virus que somete a lisis las células de microalgas, expresar un gen para producir una proteína lítica en la célula o tratar el cultivo con un agente que somete a lisis las células de microalgas. El tratamiento por vapor de microalgas

para disrupción celular es descrito por ejemplo en la Patente Estadounidense 6,750,048.

También se revela en la presente el diseño genético de microalgas que producen altos niveles de TAG para expresar un gen que somete a lisis células de microalgas, tales como por ejemplo, un gen de un virus lítico. Este gen puede ser expresado utilizando un promotor inducible, de tal manera que las células pueden primero ser cultivadas a una densidad deseable en un fermentador y luego cosechadas, seguido por inducción del promotor para expresar el gen para someter a lisis las células. Un gen que codifica una enzima poilsacárido-degradante, por ejemplo puede ser expresado para someter a lisis las células.

Opcionalmente, la lipasa puede ser expresada en un compartimiento intracelular, en donde permanece separada de la mayoría del lípido microalgal hasta la transesterificación. En general, es preferible llevar a cabo la transesterificación después que el agua ha sido sustancialmente removida de la preparación y/o se ha agregado un exceso de alcohol. Las lipasas pueden usar agua, también como alcohol, como sustrato en la transesterificación. Con agua, el lípido es conjugado a una porción de hidroxilo para producir un ácido graso polar, en lugar de un éster. Con un alcohol, tal como metanol, el lípido es conjugado a un grupo metilo, produciendo un éster de ácido graso no polar, que es comúnmente preferible para un

combustible de transportación. Para limitar la exposición de la lipasa al lípido microalgal hasta que las condiciones son apropiadas para la transesterificación para producir ésteres de ácido graso, la lipasa puede ser expresada, por ejemplo en el cloroplasto, mitocondria u otro organelo celular. Esta expresión por compartimientos da como resultado el secuestro de la lipasa de la mayoría del lípido celular hasta después que las células han sido sometidas a disrupción.

En otras modalidades particulares, la presente solicitud describe cepas diseñadas genéticamente de microalgas, levaduras oleaginosas, bacterias u hongos con uno o más genes exógenos para producir varios compuestos de hidrocarburo. Por ejemplo, microalgas que naturalmente o por medio de modificación genética, producirían altos niveles de lípidos pueden ser diseñadas (o diseñadas adicionamente) para expresar una acil-ACP tioesterasa, grasa exógena, que puede facilitar la escisión de ácidos grasos de la proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis del lípido. Estos ácidos grasos pueden ser recuperados o por medio de procesamiento enzimático adicional dentro de la célula, producir otros compuestos de hidrocarburo. Opcionalmente, la acil-ACP tioesterasa grasa puede ser expresada de un gen enlazado operativamente a un promotor inducible y/o puede ser expresada en un compartimiento intracelular.

La acil-ACP tioesterasa grasa puede ser escogida en

base a su especificidad por un ácido graso creciente (durante la síntesis de ácido graso) que tiene una longitud de cadena de carbono particular. Por ejemplo, la acil-ACP tioesterasa grasa puede tener una especificidad por una longitud de cadena de carbonos que fluctúa de 8 a 34 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 18 átomos de carbono y más preferiblemente de 10 a 14 átomos de carbono. Una especificidad por un ácido graso con 12 átomos de carbono es más preferida.

Además, la invención proporciona cepas diseñadas genéticamente de microalgas para expresar dos o más genes exógenos, tales como por ejemplo, una lipasa y un gen lítico, por ejemplo, uno que codifica una enzima polisacárido-degradante. Uno o ambos genes pueden ser expresados utilizando un promotor inducible, que permite la sincronización relativa de expresión de esos genes sea controlada para mejorar el rendimiento de lípido y conversión a ésteres de ácido graso. La invención también proporciona vectores y métodos para diseñar microbios que producen lípido para metabolizar sacarosa, que es un rasgo ventajoso debido a que permite que las células diseñadas conviertan la caña de azúcar u otras materias primas de alimentación en lípidos apropiados para la producción de aceites, combustibles, oleoquímicos y los semejantes.

En otras modalidades, la invención proporciona cepas diseñadas genéticamente de microbios (por ejemplo, microalgas, levadura oleaginosa, materias u hongos) que expresan dos o más

genes exógenos, tales como por ejemplo una acil-ACP tioesterasa grasa y una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, la acción combinada de lo cual produce un producto de alcohol. La invención proporciona además otras combinaciones de genes exógenos, en los que se incluyen sin limitación, una acil-ACP tioesterasa grasa y una proteína portadora de acilo co-expresada naturalmente para generar ácidos grasos de longitud específica o una acil-ACP tioesterasa grasa y una acil-CoA reductasa grasa para generar aldehídos. La invención también proporciona la combinación de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa y un aldehído descarbonilasa grasa para generar alcanos o alquenos. Uno o más de los genes exógenos pueden ser expresados utilizando un promoter inducible.

La invención proporciona modificaciones adicionales de microalgas, por ejemplo para proveer microalgas con características de crecimiento deseadas y/o para mejorar la cantidad y/o calidad de lípidos producidos. Por ejemplo, las microalgas pueden ser diseñadas para incrementar el flujo de carbono a la ruta del lípido y/o modificar la ruta del lípido para alterar benéficamente las proporciones o propiedades del lípido producido por las células.

La presente solicitud revela cepas diseñadas genéticamente de microalgas para expresar dos o más genes exógenos, uno que codifica un transportador de una fuente de

carbono fija (tal como sacarosa) y un segundo que codifica una enzima de invertasa sacarosa. Los organismos fermentables resultantes producen hidrocarburos a un costo de manufactura más bajo que aquél que ha sido obtenible mediante métodos previamente conocidos de producción de hidrocarburos biológicos. La inserción de los dos genes exógenos descritos anteriormente puede ser combinada con la disrupción de la biosíntesis del polisacárido por medio de mutagénesis dirigida y/o aleatoria, que dirige un flujo de carbono aun mayor a la producción de hidrocarburo. Individualmente y en combinación, la conversión trópica, diseño para alterar la producción de hidrocarburo y tratamiento con enzimas exógenas alteran la composición de hidrocarburo producida por un organismo. La alteración puede ser un cambio en la cantidad de hidrocarburos producidos, la cantidad de una o más especies de hidrocarburos producidas en relación con otros hidrocarburos y/o los tipos de especies de hidrocarburos producidos en el microorganismo. Por ejemplo, microalgas pueden ser diseñadas para producir una cantidad y/o porcentaje más alto de TAG.

III. MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN ACEITE O LÍPIDO

Se puede usar cualquier especie de organismo que produce lípido o hidrocarburo apropiado, aunque los microorganismos que producen naturalmente altos niveles de lípido o hidrocarburo apropiados son preferidos. La producción

de hidrocarburos por microorganismos es revisada por Metzger et al. Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66: 486-496 y A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel of Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann y Paul Roessler (1998).

Consideraciones que afectan la selección de microorganismos para uso en la invención incluyen, además de la producción de lípidos o hidrocarburos apropiados para la producción de aceites, combustibles y oleoquímicos: (1) alto contenido de lípido como porcentaje de peso de célula; (2) facilidad de cultivo; (3) facilidad de diseño genético; y (4) facilidad de procesamiento de biomasa. En modalidades particulares, el microorganismo tipo silvestre o diseñado genéticamente produce células que son por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65% o por lo menos 70% o más de lípido. Organismos preferidos crecen heterotróficamente (sobre azúcares en la ausencia luz) o puede ser diseñado para hacer esto utilizando, por ejemplo, los métodos revelados en la presente. La facilidad de transformación y disponibilidad de marcadores y promotores seleccionables, constitutivos y/o inducibles, que son funcionales en el microorganismo afectan la facilidad del diseño genético. Consideraciones de procesamiento pueden incluir, por ejemplo, la disponibilidad de medios efectivos para someter a lisis las células.

A. <u>Algas</u>

En una modalidad de la presente invención, el microorganismo es una microalga. Ejemplos no limitantes de microalgas que pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de microalgas

Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Bracteococcus minor, Bracteococcus medionucleatus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora (cepa SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis,

Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella ovalis, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (en las que se incluyen cualquiera de las cepas UTEX 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. Ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta,

Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEXLB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp., Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, Parachlorella kessleri, Pascheria acidophila, Pavlova sp., Phagus, Phormidium, Platymonas sp., Pleurochrysis carterae, Pleurochrysis dentate, Pleurochrysis sp., Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis, Prototheca zopfii, Pseudochlorella aquatica, Pyramimonas sp., Pyrobotrys, Rhodococcus opacus, Sarcinoid chrysophyte, Scenedesmus armatus, Schizochytrium, Spirogyra, Spirulina platensis, Stichococcus sp., Synechococcus

sp., Tetraedron, Tetraselmis sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii y Viridiella fridericiana

1. *Chlorella*

En una modalidad preferida de la presente invención, el microorganismo es del género *Chlorella*, Preferiblemente, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella minutissima* o *Chlorella emersonii*.

Chlorella es un género de alga verde de una sola célula, perteneciente al filo Chlorophyta. Es de forma esférica, de aproximadamente 2 a 10 µm de diámetro y está sin flagelos. Algunas especies de *Chlorella* son naturalmente heterotróficas.

Chlorella, particularmente *Chlorella protothecoides*, es un microorganismo preferido para uso en la invención debido de su alta composición de lípido, particularmente lípido de cadena larga apropiado para biodiesel. Además, esta microalga crece heterotróficamente y puede ser diseñada genéticamente como se demuestra en los ejemplos en la presente.

En una modalidad preferida de la presente invención, el microorganismo usado para la expresión de un transgen es del género *Chlorella*, preferiblemente, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima* o *Chlorella emersonii*. Ejemplos de expresión de transgenes en, por ejemplo, *Chlorella*, se pueden encontrar en la literatura (véase por ejemplo Current

Microbiology Vol. 35 (1997), pp. 356-362; Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2000 Jul; 16(4):443-6; *Current Microbiology* Vol. 38 (1999), pp. 335-341; *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 72: 197-205; *Marine Biotechnology* 4, 63-73, 2002; *Current Genetics* 39:5, 365-370 (2001); *Plant Cell Reports* 18:9, 778-780, (1999); *Biologia Plantarium* 42(2): 209-216, (1999); *Plant Pathol*. J 21(1): 13-20, (2005)). También véanse Ejemplos en la presente. Otras microalgas que producen lípidos pueden ser diseñadas también, en las que se incluyen microalgas procariónticas (véase Kalscheuer st al., Applied Microbiology and Biotechnology, Volumen 52, Número 4 / Octubre, 1999).

2. Identificación de Especie de *Chlorella*

Las especies de *Chlorella* para uso en la invención pueden ser identificadas mediante amplificación de ciertas regiones objetivo del genoma. Por ejemplo, la identificación de una especie o cepa de *Chlorella* específica puede ser obtenida por medio de amplificación y secuenciación de ADN nuclear y/o de cloroplasto utilizando cebadores y metodología utilizando cualquier región del genoma, por ejemplo utilizando los métodos descritos en Wu et al., *Bot. Bull. Acad. Sin*. (2001) 42:115-121 Identificación de aislados de *Chlorella spp* utilizando secuencias de ADN ribosomales. Métodos bien establecidos de análisis filogenético, tales como amplificación y secuenciación de separador transcrito interno ribosomal (ITS1 y ITS2 rDNA),

18S rRNA y otras regiones genómicas conservadas pueden ser usadas por aquellos experimentados en el arte para identificar especies no solamente de *Chlorella*, sino otros organismos que producen hidrocarburos y lípidos aptos de usar los métodos revelados en la presente. Para ejemplos de métodos de identificación y clasificación de algas véase también por ejemplo Genetics, Agosto 2005; 170(4):1601-10 y RNA, Abril 2005; 11(4):361-4.

B. Levadura Oleaginosa

En una modalidad de la presente invención, el microorganismo es una levadura oleaginosa. Ejemplos no limitantes de levadura oleaginosa que puede ser usada de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en la Tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de levadura oleaginosa.

Cryptococcus curvatus, *Cryptococcus terricolus*, *Candida sp.*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer*, *Endomycopsis vernalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis* y *Yarrowia lipolytica*

C. Otros Hongos

En una modalidad de la presente invención, el microorganismo es un hongo. Ejemplos no limitantes de hongos

que pueden ser usados de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en la Tabla 3.

Tabla 3. Ejemplos de hongos

Mortierella, *Mortierrla vinacea*, *Mortierella alpine*, *Pythium debaryanum*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Pennicillium iilacinum*, *Hensenulo*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Rhizopus y Pythium*

D. Bacterias

En una modalidad de la presente invención, el microorganismo es una bacteria.

Ejemplos de expresión de genes exógenos en bacterias, tales como *E. coli*, son bien conocidos; véase por ejemplo *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al. (3ª edición, 2001, Cold Spring Harbor Press).

IV. MÉTODOS DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos son cultivados tanto por propósitos de llevar a cabo manipulaciones genéticas y para producción subsecuente de hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos). El primer tipo de cultivo se lleva a cabo a pequeña escala e inicialmente, por lo menos, bajo condiciones en las cuales el microorganismo de partida puede crecer. Por ejemplo, si el microorganismo de

partida es un fotoautótrofo el cultivo inicial se lleva a cabo en presencia de luz. Las condiciones de cultivo pueden ser cambiadas si el microorganismo es desarrollado o diseñado para crecer independientemente de luz. El cultivo por propósitos de producción de hidrocarburos se lleva a cabo usualmente a gran escala. Preferiblemente una fuente de carbono fija está presente. El cultivo puede también ser expuesto a la luz algo o todo el tiempo.

Las microalgas pueden ser cultivadas en medios líquidos. El cultivo puede estar contenido dentro de un bioreactor. Opcionalmente, el bioreactor no permite que la luz entre. Alternativamente, las microalgas pueden también ser cultivadas en fotobioreactores que contienen una fuente de carbono fija y permitir que la luz choque con las células. La exposición de las células de microalgas a la luz, aun en presencia de una fuente de carbono fija que las células transportan y utilizan (esto es, crecimiento mixotrófico), acelera no obstante el crecimiento en comparación con el cultivo de las células en la oscuridad. Los parámetros de condiciones de cultivo pueden ser manipulados para optimizar la producción total de hidrocarburos, la combinación de especies de hidrocarburos producidas y/o producción de una especie de hidrocarburo. En algunas instancias es preferible cultivar células en la oscuridad, tal como por ejemplo cuando se usan fermentadores extremadamente grandes (de 40,000 litros y más)

que no permiten que la luz choque con el cultivo.

Los medios de cultivo de microalgas contienen comúnmente componentes tales como una fuente de nitrógeno fija, elementos en trazas, opcionalmente una solución reguladora del pH para el mantenimiento de pH y fosfato. Otros componentes pueden incluir una fuente de carbono fija tal como acetato o glucosa y sales tales como cloruro de sodio, particularmente para microalgas de agua de mar. Ejemplos de elementos en trazas incluyen zinc, boro, cobalto, cobre, manganeso y molibdeno en por ejemplo, las formas respectivas de $ZnCl_2$, H_3BO_3, $CoCl_2 \bullet 6OH_2O$, $CuCl_2 \bullet 2H_2O$, $MnCl_2 \bullet 4H_2O$ y $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \bullet 4H_2O$.

Para organismos aptos de crecer sobre una fuente de carbono fija, la fuente de carbono fija puede ser, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, xilosa, manosa, rhamnosa, N-acetilglucosamina, glicerol, floridosida y/o ácido glucurónico. La una o más fuentes de carbono pueden ser suministradas a una concentración de aproximadamente 50 µM, por lo menos aproximadamente 100 µM, por lo menos aproximadamente 500 µM, por lo menos aproximadamente 5 mM, por lo menos aproximadamente 50 mM y por lo menos aproximadamente 500 mM, de una o más fuentes de carbono fijas provistas exógenamente. Algunas especies de microalgas pueden ser cultivadas al utilizar una fuente de carbono fija tal como glucosa o acetato en ausencia de luz. Tal cultivo es conocido como cultivo heterotrófico. Para *Chlorella protothecoides*, por ejemplo, el

crecimiento heterotrófico da como resultado alta producción de biomasa y acumulación de alto contenido de lípido en las células.

Algunos microorganismos crecen naturalmente sobre o pueden ser diseñados para crecer sobre una fuente de carbono fija que es una fuente heterogénea de compuestos tales como desperdicio municipal, aguas cloacales tratadas secundariamente, agua de desperdicio y otras fuentes de carbono fijo y otros nutrientes tales como sulfatos, fosfatos y nitratos. El componente de aguas cloacales sirve como fuente de nutriente en la producción de hidrocarburos y el cultivo proporciona una fuente no cara de hidrocarburos.

Otros parámetros de cultivo pueden también ser manipulados, tales como el pH del medio de cultivo, la identidad y concentración de elementos en trazas y otros constituyentes del medio.

A. <u>Crecimiento Fotosintético</u>

Las microalgas pueden ser cultivadas en presencia de luz. El número de fotones que chocan con un cultivo de células de microalgas puede ser manipulado, también como otros parámetros tales como el espectro de longitud de onda y proporción de horas de oscuridad:luz por día. Las microalgas pueden también ser cultivadas en luz natural, también como combinaciones simultáneas y/o alternantes de luz natural y luz

artificial. Por ejemplo, las microalgas del género *Chlorella* pueden ser cultivadas bajo luz natural durante horas del día y bajo luz artificial durante horas de la noche.

El contenido de gas de un fotobioreactor para cultivar microorganismos como microalgas puede ser manipulado. Parte del volumen de un fotobioreactor puede contener gas en lugar de líquido. Se pueden usar entradas de gas para bombear gases al fotobioreactor. Se puede bombear cualquier gas a un fotobioreactor, en los que se incluyen aire, mezclas de aire/CO_2, gases nobles tales como argón y otros. La velocidad de entrada de gas a un fotobioreactor puede también ser manipulada. El incrementar el flujo de gas a un fotobioreactor incrementa la turbidez de un cultivo de microalgas. La colocación de compuertas que transportan gases a un fotobioreactor puede también afectar la turbidez de un cultivo a una velocidad de flujo de gas dada. Las mezclas de aire/CO_2 pueden ser moduladas para generar cantidades óptimas de CO_2 para el crecimiento máximo por un organismo particular. Las microalgas crecen significativamente más rápido en la luz bajo, por ejemplo 3% de CO_2/97% de aire que en 100% de aire. 3% de CO_2/97% de aire es aproximadamente 100 veces más CO_2 que el encontrado en el aire. Por ejemplo, las mezclas de aire:CO_2 de aproximadamente 99.75% de aire:0.25% de CO_2, aproximadamente 99.5% de aire:0.5% de CO_2, aproximadamente 99.0% de aire: 1.00% de CO_2, aproximadamente 98.0% de aire:2.0% de CO_2,

aproximadamente 97.0% de aire:3.0% de CO_2, aproximadamente 96.0% de aire:4.0% de CO_2, y aproximadamente 95.00% de aire:5.0% de CO_2 pueden ser infusionadas a un bioreactor o fotobioreactor.

Los cultivos de microalgas pueden también ser sometidos a mezcla utilizando dispositivos tales como hojas e impulsores de centrifugación, sacudimiento de un cultivo, barras de agitación, infusión de gas presurizado y otros instrumentos.

Los fotobioreactores pueden tener entradas que permiten entrada de gases, sólidos, semisólidos y líquidos a la cámara que contiene las microalgas. Las compuertas son anexadas usualmente a tubería u otros medios para transportar sustancias. Las compuertas de gas, por ejemplo, transportan gases al cultivo. El bombeo de gases a un fotobioreactor puede servir tanto para alimentar las células CO_2 y otros gases y para airear el cultivo y por consiguiente generar turbidez. La cantidad de turbidez de un cultivo varía a medida que el número y posición de compuertas de gases es alterado. Por ejemplo, las compuertas de gas pueden ser colocadas a lo largo del fondo de una bolsa de polietileno cilíndrica. Las microalgas crecen más rápido cuando se agrega CO_2 al aire y es bombeado a un fotobioreactor. Por ejemplo, se realiza una infusión de una mezcla de aire de 5% de CO_2:95% de aire a un fotobioreactor que contiene células de *Botryococcus* (véase por ejemplo J Agric

Food Chem. 2006 Jun 28; 54(13):4593-9; J Biosci Bioeng. 1999; 87(6):811-5; y J Nat Prod. 2003 Jun; 66(6):772-8).

Los fotobioreactores pueden ser expuestos a una o más fuentes de luz para proveer a las microalgas con luz como fuente de energía vía la luz dirigida a la superficie del fotobioreactor. Preferiblemente, la fuente de luz proporciona una intensidad que es suficiente para que las células crezcan, pero no tan intensa para provocar daños oxidante o provocar una respuesta fotoinhibidora. En algunas instancias, una fuente de luz tiene un intervalo de longitud de onda que imita o imita aproximadamente el intervalo del sol. En otras instancias, se usa un intervalo de longitud de onda diferente. Los fotobioreactores pueden ser colocados a la intemperie o en un invernadero u otro equipo que permite que la luz del sol llegue a la superficie. Las intensidades de fotones preferidas para especies del *Botryococcus* son de entre 25 y 500 µE m^{-2} s^{-1} (véase por ejemplo Fotosynth Res. 2005 Jun; 84(1-3):21-7).

Los fotobioreactores tienen preferiblemente una o más compuertas que permiten la entrada de medios. No es necesario que solamente una sustancia entre o salga de una compuerta. Por ejemplo, se puede usar una compuerta para hacer fluir medios de cultivo al fotobioreactor y luego más tarde ser usada para la toma de muestras, entrada de gas, salida de gas u otros propósitos. En algunas instancias, un fotobioreactor es llenado con medios de cultivo al comienzo de un cultivo y ya no se hace

la infusión de más medios de cultivo después que el cultivo es inoculado. En otras palabras, la biomasa de microalgas es cultivada en un medio acuoso por un período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en número; sin embargo, cantidades de medio de cultivo acuoso no se hacen fluir a través del fotobioreactor en todo el período de tiempo. Así, en algunas modalidades, el medio de cultivo acuoso no se hace fluir a través del fotobioreactor después de la inoculación.

En otras instancias, el medio de cultivo se puede hacer fluir a través del fotobioreactor en todo el período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en número. En algunas modalidades, se hace la infusión del medio al fotobioreactor después de la inoculación pero antes de que las células llegan a una densidad deseada. En otras palabras, un régimen de flujo turbulento de entrada de gas y entrada de medios no es mantenido para reproducción de microalgas hasta que se ha obtenido un incremento deseado en el número de las microalgas.

Los fotobioreactores tienen preferiblemente una o más compuertas que permiten la entrada de gas. El gas puede servir tanto para proporcionar nutrientes tales como CO_2, también como para proveer turbulencia en el medio de cultivo. La turbulencia puede ser obtenida al colocar una compuerta de entrada de gas debajo del nivel del medio de cultivo acuoso, de tal manera que

el gas que entra al fotobioreactor burbujea a la superficie del cultivo. Una o más compuertas de salida de gas permite que el gas escape, impidiendo mediante esto la acumulación de presión en el fotobioreactor. Preferiblemente una compuerta de salida de gas conduce a una válvula "unidireccional" que impide que microorganismos contaminantes entren al fotobioreactor. En algunas instancias, las células son cultivadas en un fotobioreactor por un período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en número, sin embargo, un régimen de flujo turbulento con remolinos turbulentos predominantemente en todo el medio de cultivo provocan que la entrada de gas no sea mantenida por todo el período de tiempo. En otras instancias, un régimen de flujo turbulento con remolinos turbulentos predominantemente en todo el medio de cultivo provocado por la entrada de gas puede ser mantenido por todo el período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en un número. En algunas instancias, un intervalo predeterminado de proporciones entre la escala del fotobioreactor y la escala de remolinos no es mantenido por el período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en número. En otras instancias, tal intervalo puede ser mantenido.

Los fotobioreactores tienen preferiblemente por lo menos una compuerta que puede ser usada para la toma de muestras del cultivo.

Preferiblemente, una compuerta de toma de muestras puede ser usada repetidamente sin alterar o comprometer la naturaleza axénica del cultivo. Una compuerta de toma de muestras puede ser configurada con una válvula u otro dispositivo que permite que el flujo de la muestra sea detenido e iniciado. Alternativamente una compuerta de toma de muestras puede permitir la toma de muestras continua. Los fotobioreactores tienen preferiblemente por lo menos una compuerta que permite la inoculación de un cultivo. Tal compuerta puede también ser usada para otros propósitos tales como entrada de medios o entrada de gas.

B. <u>Cultivo heterotrófico</u>

Como una alternativa al crecimiento fotosintético de microorganismos, como se describe anteriormente, algunos microorganismos pueden ser cultivados bajo condiciones de cultivo heterotróficas en las cuales una fuente de carbono fija proporciona energía para el crecimiento y acumulación de lípido.

En un método de cultivo heterotrófico de acuerdo con la invención, el costo de la producción de biodiesel, glicerol crudo, parcialmente purificado o purificado producido como producto secundario de la transesterificación de lípido puede ser empleado como materia prima de alimentación para la fermentación, por ejemplo de cultivos microbianos que producen

lípido. Así, la invención abarca cultivar un microbio (por ejemplo, una microalga) en un primer medio de cultivo; recuperar el lípido microbiano del cultivo; someter el lípido microbiano a transesterificación para producir éster(es) de ácido graso y glicerol, como se describe anteriormente; y agregar el glicerol a un segundo cultivo microbiano como materia prima de alimentación. Los primeros y segundos cultivos microbianos pueden ser pero no necesitan ser cultivos del mismo microbio. Si se desea, se puede idear un sistema continuo mediante el cual el glicerol producido del lípido recuperado de un cultivo puede ser alimentado de regreso al mismo cultivo.

La invención proporciona parámetros de cultivo significativamente mejorados que incorporan el uso de glicerol para la fermentación de múltiples géneros tanto de microbios eucariónticos como procariónticos, en los que se incluyen microbios de los géneros *Chlorella*, *Navicula*, *Scenedesmus* y *Spirulina*. Como los ejemplos lo demuestran, microbios de linajes de evaluación extremadamente divergentes, en los que se incluyen *Chlorella*, *Navicula*, *Scenedesmus* y *Spirulina* también como cultivos de múltiples especies de *Chlorella* distintas y cepas crecen muy bien sobre no solamente glicerol grado reactivo purificado, sino también sobre un producto secundario de glicerol acidulado y sin acidular de la transesterificación de biodiesel, en algunas instancias, microalgas, tales como cepas de *Chlorella*, sufren división celular más rápido en

presencia de glicerol que en presencia de glucosa. En estas instancias, procesos de cultivo de dos etapas en los cuales las células son primero alimentadas con glicerol para incrementar rápidamente la densidad calor y son luego alimentadas con glucosa para acumular lípidos pueden mejorar la eficiencia con la cual los lípidos son producidos. El uso del producto secundario de glicerol del proceso de transesterificación proporciona ventajas económicas significativas cuanto es puesta de regreso al proceso de producción. Otros métodos de alimentación son provistos también, tales como mezclas de glicerol y glucosa. La alimentación de tales mezclas también captura los mismos beneficios económicos. Además, la invención proporciona métodos de alimentación de azúcares alternativos a microalgas tales como sacarosa en varias combinaciones con glicerol. Estos beneficios provistos por la invención han sido demostrados en la presente en microbios de linajes de evolución extremadamente divergentes, en los que se incluyen tanto procariontes como eucariontes, demostrando la utilidad de la invención para la fermentación microbiana.

Métodos estándar para el cultivo y propagación de *Chlorella protothecoides* son conocidos (véase por ejemplo Miao y Wu, *J. Biotechnology*, 2004, 11: 85-93 y Miao y Wu, *Biosource Technology* (2006) 97:841-846). La invención también proporciona nuevas condiciones de cultivo para *Chlorella*. Por ejemplo, múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una

especie pueden ser cultivadas en presencia de glicerol, en los que se incluyen productos secundarios de glicerol de la transesterificación de biodiesel.

Para la producción de hidrocarburos, células, en las que se incluyen células recombinantes de la invención descritas en la presente, son preferiblemente cultivadas o fermentadas en grandes cantidades. El cultivo puede ser en volúmenes grandes de líquido, tales como en cultivo de suspensión como ejemplo. Otros ejemplos incluyen iniciar con un pequeño cultivo de células que se expanden a una biomasa grande en combinación con cultivo celular y propagación también como producción de hidrocarburo. Bioreactores o fermentadores de acero pueden ser usados para acomodar grandes volúmenes de cultivo. Un fermentador similar a aquellos usados en la producción de cerveza y/o vino es apropiado, como lo son fermentadores extremadamente grandes usados en la producción de etanol.

Se proporcionan fuentes de nutrientes apropiadas para el cultivo en un fermentador. Estos incluyen materias primas tales como una o más de los siguientes: una fuente de carbono fija tal como glucosa, almidón de maíz, material celulósico despolimerizado, sacarosa, caña de azúcar, remolacha de azúcar, lactosa, suero de leche o melasas; una fuente de grasas, tales como grasas o aceites vegetales; una fuente de nitrógeno, tal como proteína, harina de soya, licor de maíz, amoníaco (puro o en forma de sal), nitrato o sal de nitrato o nitrógeno

molecular; y una fuente de fósforo, tales como sales de fosfato. Adicionalmente, un fermentador permite el control de las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH, tensión de oxígeno y niveles de dióxido de carbono. Opcionalmente, componentes gaseosos, como oxígeno o nitrógeno, pueden ser burbujeados a través de un cultivo líquido. Otras fuentes de almidón (glucosa) tales como trigo, patata, arroz y sorgo. Otras fuentes de carbono incluyen corrientes de proceso tales como glicerol grado técnico, lico negro, ácidos orgánicos tales como acetato y melasas. Fuentes de carbono pueden también ser provistas como una mezcla, tal como una mezcla de sacarosa y pulpa de remolacha de azúcar despolimerizada.

Se puede usar un fermentador para permitir que las células sufran las varias fases de su ciclo de crecimiento. Como un ejemplo, se puede introducir un inóculo de células que producen hidrocarburos a un medio seguido por un período de retardo (fase de retardo) antes que las células comiencen a crecer. Enseguida del período de retardo, la velocidad de crecimiento se incrementa de manera estable y entra a la fase logarítmica o exponencial. La fase exponencial es su vez seguida por un frenado del crecimiento debido a disminuciones en nutrientes y/o incrementos en sustancias tóxicas. Después de este frenado, el crecimiento se detiene y las células entran a una fase estacionaria o estado estable, dependiendo del medio ambiente particular provisto a las células.

La producción de hidrocarburos por las células reveladas en la presente puede ocurrir durante la fase logarítmica o después de esta, incluyendo la fase estacionaria en donde los nutrientes son suministrados o están todavía disponibles, para permitir la continuación de la producción de hidrógeno en ausencia de división celular.

Preferiblemente, los microorganismos cultivados utilizando las condiciones descritas en la presente y conocidas en el arte comprenden por lo menos aproximadamente 20% en peso de lípido, preferiblemente por lo menos aproximadamente 40% de en peso, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 50% de en peso y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 60% de en peso.

Un descubrimiento sorprendente es que múltiples especies y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella* se desempeñan mejor en presencia del producto secundario de glicerol de la transesterificación que en una cantidad equivalente de glicerol grado reactivo. El producto secundario de glicerol de la transesterificación contiene usualmente metanol residual y otros contaminantes además de glicerol. Por ejemplo, las Figuras 1-6 demuestran que las cepas de *Chlorella protothecoides* y *Chlorella kessleri* exhiben mejor productividad sobre el producto secundario de glicerol acidulado y sin acidular de reacciones de transesterificación de lípido que cuando crecen sobre glicerol grado reactivo puro. Otros

microbios, tales como *Scenedesmus* y microalgas de *Navicula* pueden también funcionar mejor en presencia del producto secundario de glicerol de la transesterificación que una cantidad equivalente de glicerol grado reactivo.

Peso seco de célula por litro: La Figura 1 demuestra que el peso seco de célula fue más alto sobre el producto secundario de glicerol de biodiesel que sobre glicerol puro y esta tendencia se mantuvo cierta cuando las células fueron cultivadas en glicerol por sí mismo o en combinación con glucosa. La Figura 2 muestra las mismas tendencias con cepas adicionales de *Chlorella*. La Figura 12(b) demuestra que el peso seco de célula por litro de *Scenedesmus armatus* es más alto sobre el glicerol de producto secundario de biodiesel acidulado y sin acidular que sobre glicerol grado reactivo puro. La Figura 13 demuestra que el peso seco de célula por litro de *Navicula pelliculosa* es más alto sobre el glicerol de producto secundario de biodiesel sin acidular que sobre el glicerol grado reactivo puro.

Contenido de lípido por litro: Las figuras 3 y 4 demuestran que múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella*, niveles de lípido por litro son más altos cuando las células son cultivadas en presencia de producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son cultivadas en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro.

Lípido como un porcentaje de peso celular: La Figura 5 y 6 demuestran que múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella* acumulan un porcentaje más alto de peso seco de células como lípido cuando son cultivadas en presencia del producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son cultivadas en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro. La Figura 11 demuestra que tanto *Spirulina platensis* y *Navicula pelliculosa* pueden acumular un porcentaje más alto de peso seco de célula como lípido cuando son cultivadas en presencia de producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son cultivadas en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro. La Figura 12(a) demuestra que *Scenedesmus armatus* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de célula como lípido cuando son cultivadas en presencia del producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son cultivadas en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro.

Otro resultado sorprendente es que múltiples especies de microbios, en los que se incluyen microalgas tales como *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella* y otras microalgas tales como *Scenedesmus*, *Navicula* y *Spirulina* exhiben mejores características como productores de biodiesel en presencia de mezclas de glicerol y glucosa que en presencia de solamente glucosa.

Contenido de lípido por litro: La Figura 7 demuestra que *Chlorella* puede acumular niveles más altos de lípido por litro de cultivo en presencia de 1% de glicerol/1% de glucosa que en presencia de 2% de glucosa.

Lípido como porcentaje de peso de célula: La Figura 8 demuestra que *Chlorella* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de células como lípido cuando es cultivada en presencia de una mezcla de igual concentración (por ciento en peso) de glicerol y glucosa que cuando es cultivada en presencia de solamente glucosa. La Figura 11(a) demuestra que *Spirulina platensis* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de célula como lípido cuando es cultivada en presencia de una mezcla de igual concentración (por ciento en peso) de glicerol producto secundario de biodiesel y glucosa que cuando es cultivada en presencia de solamente glucosa. La Figura 11(b) demuestra que *Navicula pelliculosa* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de células como lípido cuando es cultivada en presencia de una mezcla de igual concentración (por ciento en peso) de glicerol grado reactivo y glucosa, también como glicerol producto secundario de biodiesel y glucosa, que cuando es cultivada en presencia de solamente glucosa. La Figura 12(b) demuestra que *Scenedesmus armatus* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de células como lípido cuando es cultivada en presencia de igual concentración (por ciento en peso) de glicerol producto

secundario de biodiesel y glucosa que cuando es cultivada en presencia de solamente glucosa.

Un descubrimiento adicional e inesperado es que la adición de glicerol y glucosa al microbio, en los que se incluyen microalgas tales como *Chlorella, Scenedesmus* y *Navicula* secuencialmente en lugar de que como una sola mezcla lote de glicerol y glucosa puede generar ganancias de rendimiento adicionales. Este atributo de múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella* fue probado en presencia tanto del producto secundario de glicerol de biodiesel como de glicerol grado reactivo.

Lípido como porcentaje de peso de célula: La Figura 8 demuestra que *Chlorella* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de célula como lípido cuando se agrega glicerol a un cultivo por un primer período de tiempo, seguido por la adición de glucosa y cultivo proseguido por un segundo período de tiempo, que cuando las mismas cantidades de glicerol y glucosa son agregadas conjuntamente al comienzo del experimento.

Contenido de lípido por litro: La Figura 9 muestra que *Chlorella* que exhibe niveles más altos de lípido por litro de cultivo cuando glicerol y glucosa son agregados secuencialmente que cuando las mismas cantidades de glicerol y glucosa son agregadas conjuntamente al comienzo del experimento. Esta tendencia fue observada cuando el glicerol

producto secundario de biodiesel acidulado, glicerol producto secundario de biodiesel sin acidular o glicerol grado reactivo fue utilizado.

Peso seco de célula por litro: La Figura 10 demuestra cuatro cepas diferentes de *Chlorella* de dos especies diferentes que acumulan un peso seco de células más alto por litro de cultivo cuando glicerol y glucosa son agregados secuencialmente que cuando las mismas cantidades de glicerol y glucosa son agregadas conjuntamente al comienzo del experimento. Esta tendencia fue observada cuando el glicerol producto secundario de biodiesel acidulado, glicerol producto secundario de biodiesel sin acidular o glicerol grado reactivo fue utilizado. Las Figuras 14(a) y (b) demuestran que tanto *Scenedesmus armatus* y *Navicula pelliculosa* pueden exhibir incrementos en peso seco de célula por litro cuando el glicerol producto secundario de biodiesel solamente es agregado a un cultivo por un primer período de tiempo, seguido más tarde por la adición de glucosa, en comparación con la adición de cantidades idénticas de glicerol y glucosa al comienzo de la fermentación.

Tres diferentes marcadores de productividad (peso seco de célula por litro, gramos por litro de lípidos y porcentaje de peso seco de células como lípido) en la producción de lípido microbiana son mejorados mediante el uso del producto secundario de biodiesel y separación temporal de fuentes de carbono. La invención por consiguiente proporciona

nuevos métodos para generar cantidades más altas de lípido por tiempo unitario en múltiples especies de microbios a partir de áreas altamente divergentes del árbol evolutivo, en los que se incluyen tanto procariontes como eucariontes. Los métodos para manufactura de lípidos e hidrocarburos revelados en la presente utilizando glicerol no están limitados a microalgas, si no que pueden ser usados con cualquier microbio capaz de utilizar glicerol como fuente de energía.

En un método de crecimiento heterotrófico alternativo de acuerdo con la presente invención, los microorganismos pueden ser cultivados utilizando biomasa celulósica despolimerizada como materia prima de alimentación. La biomasa celulósica (por ejemplo, rastrojo, tal como rastrojo de maíz) es no cara y está fácilmente disponible; sin embargo, los intentos para usar este material como materia prima de alimentación por levadura han fracasado. En particular, se ha encontrado que tal materia prima de alimentación es inhibidora al crecimiento de levadura y la levadura no puede usar los azúcares de cinco carbonos producidos a partir de materiales celulósicos (por ejemplo, xilosa de hemicelulosa). En contraste, las microalgas pueden crecer sobre material celulósico procesado. Así, la invención proporciona un método para cultivar microalgas en presencia de un material celulósico y/o un azúcar de cinco átomos de carbono. Los materiales celulósicos incluyen en general:

Componente	**Por ciento en peso seco**
Celulosa	40-60%
Hemicelulosa	20-40%
Lignina	10-30%

Componente	Por ciento peso seco
Celulosa	40-60%
Hemicelulosa	20-40%
Lignina	10-30%

Materiales celulósicos apropiados incluyen residuos de cosechas de energía herbácea y cosechas de energía de madera, también como cosechas agrícolas, esto es, las partes de plantas, principalmente tallos y hojas, no removidos de los campos del producto alimenticio o de fibra primarios. Ejemplos incluyen desperdicios agrícolas tales como bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, fibra de maíz (que incluyen tallos, hojas, cáscaras y mazorcas), paja de trigo, paja de arroz, pulpa de chocolate de azúcar, pulpa cítrica, cáscaras cítricas; desperdicios forestales tales como madera dura y adelgazamiento de madera blanda y residuos de madera dura y madera blanda de operaciones de maderanes; desperdicios de madera tales como desperdicios de molino de tierra (virutas de madera, polvo de madera) y desperdicio de molino de pulpa; residuos urbanos tales como fracciones de papel de residuos sólidos municipales; residuos de madera urbana y residuos orgánicos urbanos tales

como fragmentos de césped municipal y residuos de construcción con madera. Celulósicos adicionales incluyen cosechas celulósicas dedicadas tales como pasto varilla, madera de álamo híbrido y miscanto, caña de azúcar y fibra de sorgo. Los azúcares de cinco átomos de carbono que son producidos a partir de tales materiales incluyen xilosa.

Sorprendentemente, se ha demostrado en la presente que algunas especies de *Chlorella* exhiben niveles más altos de productividad cuando son cultivados en una combinación de glucosa y xilosa que cuando son cultivados ya sea sobre glucosa o xilosa solos. Este efecto sinergístico proporciona una ventaja significativa en que permite el cultivo de *Chlorella* sobre combinaciones de xilosa y glucosa, tal como material celulósico y se muestran en la Figura 15.

En todavía otro método de cultivo heterotrófico alternativo de acuerdo con la presente invención, que puede opcionalmente ser usado por sí mismo en combinación con los métodos descritos anteriormente, sacarosa, producido por ejemplo a partir de caña de azúcar o remolacha de azúcar, es usada como materia prima de alimentación. Como se describe en mayor detalle en la sección intitulada “Diseño de Microbios” posteriormente en la presente, la producción de lípido puede ser facilitada o hacerse más eficiente por medio del diseño de microbios tales *Chlorella*, para utilizar sacarosa como fuente de carbono. Por ejemplo, la expresión de un transportador de

ascarasa y una invertasas agarosa permite que *Chlorella* transporte sacarosa a la célula del medio de cultivo e hidrolice sacarosa para producir glucosa y fructosa. Opcionalmente, una fructocinasa puede ser expresada también en instancias en donde la actividad de hexocinasa endógena es suficiente para la fosforilación máxima de fructosa. Ejemplos de transportadores útiles de sacarosa apropiados son los números de acceso GenBank CAD91334, CAB92307 y CAA53390. Ejemplos de invertasas de sacarosa apropiados son números de acceso GenBank CAB95010, NP_012104 y CAA06839. Ejemplos de invertasas de sacarosa apropiadas son números de acceso de GenBank P26984, P26420 y CAA43322. Vectores para transformación de microalgas, en las que se incluyen *Chlorella*, que codifican uno o más de tales genes pueden ser diseñados como se describe en la presente.

La secreción de una invertasa de sacarosa puede obviar la necesidad de expresión de un transportador que puede transportar sacarosa a la célula. Esta es debida a una invertasa secretada cataliza la conversión de una molécula de sacarosa en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa, ambas que pueden ser transportadas y utilizadas por los microbios revelados en la presente. Por ejemplo, la expresión de una invertasa de sacarosa (tal como SEQ ID NO: 14) con una señal de secreción (tal como aquella de SEQ ID NO: 15 (de levadura), SEQ ID NO: 16 (de plantas superiores), SEQ ID NO: 17

(señal de secreción de consenso eucarióntica) y SEQ ID BO: 18 (combinación de secuencias de señal de plantas superiores y consenso eucarióntico) generan actividad de invertasa al exterior de la célula. Véase Hawkins et al., Curren Microbiology Vol. 38 (1999), pp. 335-341 para ejemplos de señales de secreción activa en *Chlorella*. La expresión de tal proteína, tal como la deshabilitada por la metodología de diseño genético revelada en la presente, permite que las células sean capaces de utilizar glucosa extracelular como una fuente de energía al utilizar sacarosa como una fuente de energía extracelular. En células tales como *Chlorella protothecoides, Chlorella minutissima* y *Chlorella emersonii* tales como las demostradas en la presente pueden usar tanto fructosa extracelular como glucosa extracelular como fuentes de energía, la secreción de una invertasa puede proporcionar la única actividad catalítica necesaria para usar sacarosa como una fuente de energía eficiente, no cara.

Por ejemplo, como se muestra en la Figura 26, *Chlorella protothecoides* puede ser diseñada con un gen de invertasa de sacarosa bajo el control regulador de uno de tres promotores (promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CMV), promotor de virus de *Chlorella* (CV) o promotor HUP1 de *Chlorella* (HUP1)). El gen de invertasa de sacarosa utilizado en este ejemplo comprende una modificación al gen SUC2 de *S. cerevisiae* para optimizar el uso del codón de *C.*

protothecoides. El cADN y secuencias de aminoácidos del gen optimizado corresponden a SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 19, respectivamente. Una ilustración de los constructos de plásmido usados en la transformación es mostrada en la Figura 25. La expresión de una invertasa de sacarosa secretante, tal como aquella descrita en la presente, permite el uso de melazas, jugo de caña de azúcar y otras materias primas de alimentación que contienen sacarosa para la fermentación celular.

Similarmente, las Figuras 27 y 28 muestran los resultados de transformación de *Chlorella protothecoides* y *Chlorella minutissima* y *Chlorella emersonii*, respectivamente, con el gen de invertasa sacarosa de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor de CMV.

El potencial de crecimiento de microorganismos que expresan una invertasa de sacarosa secretable exógena es ilustrado por la adición de una invertasa al medio de cultivo de *Chlorella protothecoides*, como se describe en detalle adicional en los Ejemplos. Las Figuras 23 y 24 ilustran el resultado sorprendente de que las células de *Chlorella* crecen también sobre melazas de desperdicio del procesamiento de caña de azúcar como lo hacen sobre la glucosa pura grado reactivo; el uso de este producto de desperdicio de bajo valor del procesamiento de caña de azúcar puede proveer ahorros significativos de costos en la producción de hidrocarburos y otros aceites. Las melazas contienen lignina y otros productos

de desperdicio celulósicos que envenenan muchos microorganismos y retardan su crecimiento, sin embargo se descubrió que las células de *Chlorella* prosperan en presencia de tales venenos. Las Figuras 23-24 muestran el crecimiento de células sobre tres fuentes únicas de melazas (designadas como BS1, BS2 y HTM), en comparación con el crecimiento sobre glucosa o sacarosa en presencia o ausencia de una invertasa de sacarosa extracelular.

Alternativamente, una invertasa de sacarosa puede también ser expresada intracelularmente en células que expresan un transportador de sacarosa, también como en células que expresan cualquier transportador de carbohidrato que permiten que la sacarosa entre a la célula.

Un gen extraño fue transformado a y expresado en *Chlorella protothecoides*, como se describe en el Ejemplo 12. La expresión del gen de utilización de sacarosa puede ser acompañado utilizando la misma metodología o metodología similar y diseño de vector.

Se pueden emplear biorreactores para uso en los métodos de crecimiento heterotróficos. Como se apreciará, precisiones hechas para hacer la luz disponible a las células en métodos de cultivo fotosintéticos son innecesarias cuando se usa una fuente de carbono fija en los métodos de cultivo heterotróficos descritos en la presente.

Los ejemplos específicos de condiciones de proceso y métodos de crecimiento heterotróficos descritos en la presente

pueden ser combinados de cualquier manera apropiada para mejorar las eficiencias de crecimiento microbiano y producción de lípidos. Además, la invención incluye la selección y/o diseño genético de microbios, tales como microalgas, para producir microbios que son aún más apropiados para uso en los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, los microbios que tienen una mayor habilidad para utilizar cualquiera de las materias primas de alimentación descritas en la presente para la proliferación incrementada y/o producción de lípido (por ejemplo, ácidos grasos) están dentro del alcance de la invención.

C. Crecimiento mixotrófico

El crecimiento mixotrófico es el uso tanto de luz como fuentes de carbono fijas como fuentes de energía para el crecimiento de células que produzcan hidrocarburos. El crecimiento mixotróficos se puede llevar a cabo en un fotobiorreactor. Las microalgas pueden ser cultivadas y mantenidas en fotobiorreactores cerrados fabricados de diferentes tipos de material transparente o semitransparente. Tal material puede incluir envolventes de Plexiglas®, envolventes de vidrio, bolsas fabricadas de sustancias tales como polietileno, tubos transparentes o semitransparentes y otros materiales. Las microalgas pueden ser cultivadas o mantenidas en fotobiorreactores abiertos tales como lagunas de

canales, lagunas de tratamiento y otros recipientes no encerrados.

D. Medios de cultivo

Microorganismos útiles de acuerdo con el método de la presente invención son encontrados en varias locaciones y medios ambientes en todo el mundo. Como consecuencia de su aislamiento de otras especies y su divergencia evolutiva constante, el medio de cultivo particular para el crecimiento óptimo y generación de constituyentes de lípido y/o hidrocarburo pueden ser difíciles de predecir. En algunos casos, ciertas cepas de microorganismos pueden ser no aptas de crecer sobre un medio de cultivo particular debido a la presencia de algún componente inhibidor o a la ausencia de algún requerimiento nutricional esencial requerido por la cepa particular del microorganismo.

Medios de cultivo sólidos y líquidos están en general disponibles de una amplia variedad de fuentes e instrucciones para la preparación de medios particulares que son apropiados para una amplia variedad de cepas de microorganismos se pueden encontrar por ejemplo, en línea en http://www.utex.org/, un sitio mantenido por la Universidad de Texas en Austin para su recolección de cultivo de algas (UTEX). Por ejemplo, varios medios e agua dulce y agua salada incluyen aquellos mostrados en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Medios de algas ejemplares.

Medio de agua dulce	Medio de agua salada
Medio de diatomea 1/2 CHEV	1% F/2
Medio de diatomea 1/3 CHEV	Medio de agua de mar enriquecido 1/2
Medio de diatomea 1/5 CHEV	Medio Erdchreiber 1/2
DYIII/PEA + Gr+ 1:1	Medio de agua de mar + 1/2 de sustrato
Medio de diatomea 2/3 CHEV	Medio de agua de mar + 1/3 de sustrato
Medio de diatomea 2X CHEV	1/4 ERD
Medio de diatomea Ag	Medio de agua de mar + 1/4 de sustrato
Medio Allen	Medio de agua de mar + 1/2 de sustrato
Medio BG11-1	Medio de agua de mar enriquecido 2/3
Medio INV Negritas	20% Allen + 80% ERD
Medio 3N Negritas	Medio de Erdschreiber 2X
Medio de Botryococcus	Medio de agua de mar + sustrato 2X
Medio Bristol	Medio F/2 al 5%
Medio de diatomea CHEV	Medio de agar en agua de mar + sustrato 5/3

Medio de Chu	Medio artificial de agua de mar
Medio de diatomea CR1	BG11-1 + Medio de NaCl al 36%
Medio de diatomea XR1+	BG11-1 + Medio de NaCl al 1%
Medio de diatomea CR1-S	INV Negritas:Erdshreiber (1:1)
Medio de Cyanidium	INV Negritas:Erdshreiber (4:1)
Medio de cianofíceas	Medio de Bristol-NaCl
Medio Desmid	Medio de agua de mar con Dasycladales
Medio DYIII	Medio de agua de mar enriquecido
Medio Euglena	Medio Erdshreiber
Medio HEPES	Medio de agua de mar enriquecido ES/10
Medio J	Medio de agua de mar enriquecido ES/2
Medio Malt	Medio de agua de mar enriquecido ES/4
Medio MES	Medio F/2
Medio modificado 3N Negritas	F/2 + NH4
Medio modificado COMBO	Medio LDM
Medio N/20	CHEV modificado 2 X
Medio Ochromonas	CHEV modificado 2 X + sustrato
Medio P49	Medio artificial modificado de agua de mar
Medio Polytomella	CHEV modificado
Medio proteosa	Medio Porphridium
Medio de alga congelada	Medio de agua de mar + sustrato
Medio con extracto de sustrato	Medio de diatomea SS
Sustrato en agua: Medio BAR	
Sustrato en agua: Medio-GR	
Sustrato en agua: Medio GR-/NH4	
Sustrato en agua: Medio GR+	
Sustrato en agua: Medio GR+/NH4	
Sustrato en agua: Medio PEA	
Sustrato en agua: Medio de turba	
Sustrato en agua: Medio VT	
Medio Spirulina	
Medio de unión	
Medio Trebouxia	
Medio Volvocáceo	
Medio volvocáceo-3N	
Medio Volvox	
Medio Volvox-Dextrosa	
Medio Waris	
Waris + medio con extracto de sustrato	

En un ejemplo particular, un medio apropiado para el cultivo de *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) comprende medio de proteosa. Este medio es apropiado para cultivos axénicos y un volumen de un litro del medio (pH de aproximadamente 6.8) puede ser preparado mediante la adición de un gramo de peptona

proteosa a un litro de medio de Bristol. El medio de Bristol comprende $NaNO_3$ 2.94 mM, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.17 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 mM, KH_2PO_4 0.43 mM, 1.29 mM y NaCl 1.43 mM en una solución acuosa. Para un medio de agar al 1.5%, se pueden agregar 15 g de agar a un litro de la solución. La solución es cubierta y puesta en autoclave y luego almacenada a una temperatura refrigerada antes de su uso.

Otros medios apropiados para uso con los métodos de la invención pueden ser identificados fácilmente al consultar la URL identificada anteriormente o al consultar otras organizaciones que mantienen cultivos de microorganismos, tales como SAG, CCAP o CCALA. SAG se refiere a la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Göttingen (Göttingen, Alemania), CCAP se refiere a la colección de cultivos de algas y protozoarios administrada por la Asociación Escocesa para las Ciencias Marinas (Escocia, Reino Unido de la Gran Bretaña) y CCALA se refiere a la colección de cultivos de algas en laboratorio en el Instituto de Botánica (Třeboň, República Checa).

E. Rendimiento incrementado de lípidos

Las condiciones del proceso pueden ser ajustadas para incrementar el rendimiento de lípidos apropiados para un uso particular y/o para reducir el costo de producción. Por ejemplo, en ciertas modalidades, un microbio (por ejemplo, una

microalga) es cultivado en presencia de una concentración limitante de uno o más nutrientes, tales como por ejemplo, carbono y/o nitrógeno, fósforo o azufre, en tanto que se proporciona un exceso de energía de carbono fija como glucosa. La limitación de nitrógeno tiende a incrementar el rendimiento del lípido microbiano con respecto al rendimiento del lípido microbiano en un cultivo en el cual se proporciona nitrógeno en exceso. En modalidades particulares, el incremento en rendimiento de lípido es de por lo menos aproximadamente: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500%. El microbio puede ser cultivado en presencia de una cantidad limitante de un nutriente por una porción del período de cultivo total o por todo el período. En modalidades particulares, la concentración del nutriente es sometida a ciclos entre una concentración limitante y una concentración no limitante por lo menos dos veces durante el período de cultivo total.

Para incrementar el rendimiento del lípido, se puede usar ácido acético como materia prima de alimentación para un microbio que produce lípido (por ejemplo, microalgas). El ácido acético se alimenta directamente al punto de metabolismo que inicia la síntesis del ácido graso (esto es, acetil-CoA); proporcionando así ácido acético en el cultivo que puede incrementar la producción de ácido graso. En general, el microbio es cultivado en presencia de una cantidad suficiente

de ácido acético para incrementar el rendimiento de lípido microbiano y/o el rendimiento de ácido graso microbiano, específicamente, con respecto al rendimiento del lípido microbiano (por ejemplo, ácidos grasos) en ausencia del ácido acético.

En otra modalidad, el rendimiento del lípido es incrementado al cultivar un microbio que produce lípidos (por ejemplo, microalgas) en presencia de uno o más co-factores para una enzima de ruta de lípido (por ejemplo, una enzima sintética de ácido graso). En general, la concentración del (los) co-factor (es) es suficiente para incrementar el rendimiento del lípido microbiano (por ejemplo ácido graso) con respecto al rendimiento del lípido microbiano en ausencia del (los) co-factor (es). En una modalidad particular, el (los) co-factor (es) es (son) provisto (s) al cultivo al incluir en el cultivo un microbio (por ejemplo, microalgas) que contiene un gen exógeno que codifica el (los) co-factor (es). Alternativamente, se pueden proveer co-factores a un cultivo al incluir un microbio (por ejemplo, microalgas) que contiene un gen exógeno que codifica una proteína que participa en la síntesis del co-factor. En ciertas modalidades, co-factores apropiados incluyen cualquier vitamina requerida por una enzima de ruta de lípido, tal como por ejemplo: biotina, pantotenato. Genes que codifican co-factores apropiados para uso en la invención o que participan en la síntesis de tales co-factores son bien

conocidos y pueden ser introducidos a microbios (por ejemplo, microalgas) utilizando conceptos y técnicas tales como aquellos descritos anteriormente.

V. DISEÑO DE RUTA DEL LÍPIDO

En algunas modalidades de la presente invención, los microorganismos de la presente invención son modificados para alterar las propiedades y/o proporciones de lípidos conocidos y/o para incrementar el flujo de carbono a los lípidos. La ruta puede además o alternativamente ser modificada para alterar las propiedades y/o proporciones de varias moléculas de hidrocarburo producidas por medio del procesamiento enzimático de lípidos.

A. Alteración de propiedades o proporción de lípido o hidrocarburos producidos

En el caso de microalgas, algunas células tipo silvestre ya tienen características de crecimiento buenas pero no producen los tipos o cantidades deseados de lípidos. Ejemplos incluyen *Pyrobotrys*, *Phormidium*, *Agmenellum*, *Carteria*, *Lepocinclis*, *Pyrobotrys*, *Nitzschia*, *Lepocinclis*, *Anabaena*, *Euglena*, *Spirogyra*, *Chlorococcum*, *Tetraedron*, *Oscillatoria*, *Phagus* y *Chlorogonium* que tienen la característica de crecimiento deseable de crecimiento en aguas residuales municipales o agua de desperdicio. Tales células, también como

especies de *Chlorella* y otros microbios, pueden ser diseñados para tener características de producción de lípido mejoradas. Las características deseadas incluyen optimización del rendimiento de lípido por volumen unitario y/o por tiempo unitario, longitud de cadenas de carbono (por ejemplo, para producción de biodiesel o para aplicaciones iníciales que requieren materia prima de alimentación de hidrocarburo), reduciendo el número de dobles o triples enlaces, opcionalmente a cero, remover o eliminar anillos y estructuras cíclicas e incrementar la proporción de hidrógeno: carbono de una especie particular de lípido o de una población de lípido distinta. Además, las microalgas que producen hidrocarburos apropiados pueden también ser diseñadas para tener salidas de hidrocarburos aún más deseables. Ejemplos de tales microalgas incluyen especies del género *Chlorella*.

1. Regulación de enzimas que controlan los puntos de ramificación en la síntesis de ácido graso

En modalidades particulares, una o más enzimas clave que controlan los puntos de ramificación en el metabolismo para la síntesis de ácido graso pueden ser reguladas ascendentemente o reguladas descendentemente para mejorar la producción del lípido. La regulación ascendente puede ser detenida por ejemplo al transformar células con los conceptos de expresión en los cuales un gen que codifica la enzima de interés es expresada,

por ejemplo utilizando un promotor fuerte y/o elementos de mejorador que incrementan la transición. Tales conceptos pueden incluir un marcador seleccionable, de tal manera que los transformantes pueden ser sometidos a selección, lo que puede dar como resultado la aplicación del concepto y un incremento en el nivel de expresión de la enzima codificada. Ejemplos de enzimas apropiadas para la regulación ascendente de acuerdo con los métodos de la invención incluyen piruvato deshidrogenasa, que juega un papel para convertir piruvato a acetil-CoA (ejemplos, algunos de algas, incluyen los números de accesos Genbank NP_415392; AAA53047; Q1XDM1 y CAF05587). La regulación ascendente de la piruvato deshidrogenasa puede incrementar la producción de acetil-CoA e incrementar mediante esto la síntesis de ácido graso. La acetil-CoA carboxilasa cataliza la etapa inicial en la síntesis de ácido graso. Así, esta enzima puede ser regulada ascendentemente para incrementar la producción de ácidos grasos (ejemplo, algunos de microalgas, incluyen los números de acceso Genbank BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP_537052; YP_536879; NP_045833 y BAA57908). La producción de ácido graso puede también ser incrementada mediante la regulación ascendente de la proteína portadora de acilo (ACP), que porta las cadenas de acilo crecientes durante la síntesis de ácido graso (ejemplos, algunos de microalgas, incluyen los números de acceso Genbank A0T0F8; P51280; NP_84041; YP_874433). La glicerol-3-fosfatoacetiltransferasa

cataliza la etapa limitante de la velocidad de la síntesis de ácido graso. La regulación ascendente de esta enzima puede incrementar la producción de ácido graso (ejemplos, algunos de microalgas, incluyen los números de acceso Genbank AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857 y ABO94442). Las proteínas precedentes son candidatos para expresión en microalgas, en las que se incluyen especies del género *Chlorella*.

La regulación descendente de una enzima de interés puede ser obtenida utilizando por ejemplo ARN/ADN catalítico antisentido, interferencia de ARN (ARN_i), "desactivación", "apagado" u otras técnicas de mutagénesis. La expresión/función de enzima puede también ser inhibida utilizando intracuerpos. Ejemplos de enzimas apropiadas para regulación descendente de acuerdo con los métodos de la invención incluyen citrato sintasa, que consume acetil-CoA como parte del ciclo de ácido tricarboxílico (TCA). La regulación descendente de citrato sintasa puede forzar a más acetil-CoA a la ruta de síntesis de ácido graso.

2. Modulación de reguladores globales de genes de síntesis de ácido graso

Los reguladores globales modulan la expresión de los genes de las rutas biosintéticas de ácido graso. Así, uno o más reguladores globales de la síntesis de ácido graso deben ser regulados ascendentemente o regulados descendentemente, como

sea apropiado, para inhibir o mejorar, respectivamente, la expresión de una prioridad de genes sintéticos de ácido graso y finalmente, para incrementar la producción de lípido. Ejemplos incluyen proteínas de enlace de elementos regulatorios de esterol (SREBPs), tales como SREBP-1a y SREBP-1c (para ejemplos véanse los números de acceso Genbank NP_035610 y Q9WTN3). Los reguladores globales pueden ser regulados ascendentemente o regulados descendentemente, por ejemplo, como se describe anteriormente con respecto a la regulación de enzima de punto de control.

3. Regulación de enzima de modificación de hidrocarburo

Los métodos de la invención también incluyen células transformantes, con uno o más genes que codifican enzimas de modificación de hidrocarburo tales como por ejemplo una acil-ACP tioesterasa grasa (véanse ejemplos en la tabla 5 con números de acceso), una acil-CoA/aldehído reductasa grasa (véanse ejemplos en la tabla 6 con números de acceso), una acil-CoA reductasa grasa (véanse ejemplos en la tabla 7 con números de acceso), una aldehído descarbonilasa grasa (véanse ejemplos en la tabla 8 con números de acceso), una aldehído reductasa grasa o un gen de escualeno sintasa (véase número de acceso Genbank AF205791). En algunas modalidades, genes que codifican una acil-ACP tioesterasa grasa y una proteína portadora de acilo co-expresada naturalmente pueden ser

transformados a una célula, opcionalmente con uno o más genes que codifican otras enzimas de modificación de hidrocarburo. En otras modalidades, la ACP y acil-ACP tioesterasa grasa pueden tener una afinidad entre sí que imparte una ventaja cuando las dos son usadas conjuntamente en los microbios y métodos de la presente invención, sin consideración de si son co-expresadas naturalmente en un tejido u organismo particular. Así, la presente invención contempla tanto pares co-expresados naturalmente de estas enzimas, también como aquellos que comparten una afinidad para interactuar entre sí para facilitar la escisión de una cadena de carbono de los sitios específica de la ACP.

En todavía otras modalidades, un gen exógeno que codifica una desaturasa puede ser transformado a la célula en conjunción con uno o más genes que codifican otras enzimas de modificación de hidrocarburos con el fin de proveer modificaciones con respecto a la saturación de hidrocarburo. La estearoil-ACP desaturasa (véase, por ejemplo números de acceso Genbank AAF15308; ABM45911 y AAY86086), por ejemplo cataliza la conversión de estearoil-ACP a oloil-ACP. La regulación ascendente de este gen puede incrementar la proporción de ácidos grasos monoinsaturados producidos por una célula; mientras que la regulación descendente puede reducir la proporción de monoinsaturados. Similarmente, la expresión de una o más glicerolípido desaturasas puede ser controlada para

alterar la proporción de los ácidos grasos insaturados a saturados, tales como desaturasa de ácido graso omega-6, desaturasa de ácido graso omega-3, o desaturasa omega-6-oleato. En algunas modalidades, la desaturasa puede ser seleccionada con referencia a una longitud de cadena de carbono deseada, de tal manera que la desaturasa es capaz de realizar modificaciones específicas de sitio dentro de un sustrato de longitud de carbono especificado o sustratos que tienen una longitud de carbono dentro de un intervalo especificado.

En modalidades particulares, los microbios de la presente invención son diseñados genéticamente para expresar uno o más genes exógenos seleccionados de una acil-ACP tioesterasa grasa, acil-CoA/aldehído reductasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa, un aldehído descarbonilasa grasa o una proteína portadora de acilo co-expresada naturalmente. Métodos de expresión apropiados son descritos anteriormente con respecto a la expresión de un gen de lipasa, en los que se incluyen, entre otros métodos, expresión inducible y expresión por combatimientos.

Sin pretender estar limitados por alguna teoría particular o mecanismo celular, una acil-ACP tioesterasa grasa escinde un ácido graso de una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis de lípido. Por medio de tratamiento enzimático adicional, el acido graso escindido es luego combinado con una co-enzima para producir una molécula de acil-

CoA. Esta acil-CoA es el sustrato para la actividad enzimática de una acil-CoA reductasa grasa para producir un aldehído, también como para una acil-CoA/aldehído reductasa grasa para producir un alcohol. El aldehído producido por la acción de la acil-CoA reductasa grasa identificado anteriormente es el sustrato para actividad enzimática adicional ya sea por una aldehído reductasa grasa para producir un alcohol o un aldehído desacaboxilasa grasa para producir un alcano o alqueno.

Las enzimas descritas directamente antes tienen una especificidad para actuar sobre un sustrato que incluye un número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, una acil-ACP tioesterasa grasa puede tener una especificidad para escindir un ácido graso que tiene doce átomos de carbono de la ACP. En algunas modalidades, la ACP y la tioesterasa longitud-específica pueden tener una afinidad entre sí que las hace particularmente útiles como una combinación (por ejemplo, la ACP exógena y los genes de tioesterasa pueden ser co-expresados naturalmente en un tejido u organismo particular del cual son derivados). Por consiguiente, en varias modalidades, el microbio puede contener un gen exógeno que codifica una proteína con especificidad para catalizar una actividad enzimática (por ejemplo, escisión de un ácido graso de una ACP, reducción de una acil-CoA a un aldehído o un alcohol o conversión de un aldehído a un alcano) con respecto al número de átomos de carbono contenidos en el sustrato. La

especificidad enzimática puede ser en varias modalidades, por un sustrato que tiene de 8 a 34 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 18 átomos de carbono y más preferiblemente de 10 a 14 átomos de carbono. La especificidad más preferida es para un sustrato que tienen doce átomos de carbono. En otras modalidades, la especificidad puede ser para 20 a 30 átomos de carbono.

Acil-ACP tioesterasa grasa apropiada para uso con los microbios y métodos de invención incluyen sin limitación aquellos indicados en la tabla 5.

Tabla 5. Acil-ACP tioesterasas grasas y números de acceso Genbank

Umellularia califórnica acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAC49001)
Cinnamomum camphora acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # Q39473)
Umbellularia califórnica acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # Q41635)
Myristica fragrans acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAB71729)
Myristica fragrans acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAB71730)
Elaeis guineensis acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABD83939)

Elaeis guineensis acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAD42220)

Populus tormentosa acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABC47311)

Arabidopsis thaliana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # NP_172327)

Arabidopsis thaliana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAA85387)

Arabidopsis thaliana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAA85388)

Gossypium hirsutum acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # O9SOI3)

Cuphea lanceolata acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAA54060)

Cuphea hookeriana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAC72882)

Cuphea calophylla subsp. mesostemon acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABB71581)

Cuphea lanceolata acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAC19933)

Elaeis guineensis acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAL15645)

Cuphea hookeriana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # Q39513)

Gossypium hirsutum acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank #

AAD01982)

Vitis vinifera acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAN81819)

Garcinia mangostana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAB51525)

Brassica juncea acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABI18986)

Madhuca longifolia acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAX51637)

Brassica napus acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABH11710)

Oryza sativa (grupo de cultivo indica) acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # EAY86877)

Oryza sativa (grupo de cultivo japonica) acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # NP_001068400)

Oryza sativa (grupo de cultivo indica) acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # EAY99617)

Cuphea hookeriana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAC49269)

Acil-CoA grasas/aldehído reductasa grasa apropiadas para uso con microbios y métodos de invención incluyen sin limitación aquellas enlistadas en la tabla 6.

Tabla 6. Acil- CoA/aldehído reductasa grasas enlistadas por número de acceso Gen Bank.

AAC45217, YP_047869, BAB85476, YP_001086217, YP_001280274,

YP_264583, YP_436109, YP_959769, ZP_01736962, ZP_01900335, ZP_01892096, ZP_01103974, ZP_01915077, YP_924106, YP_130411, ZP_01222731, YP_550815, YP_983712, YP_001019688, YP_524762, YP_856798, ZP_011155000, YP_001141848, NP_336047, NP_216059, YP_882409, YP_706156, YP_001136150, YP_952365, ZP_01221833, YP_130076, NP_567936, AAR88762, ABK28586, NP_197634, CAD30694, NP_001063962, BAD46254, NP_001030809, EAZ10132, EAZ43639, EAZ07989, NP_001062488, CAB88537, NP_001052541, CAH66597, CAE02214, CAH66590, CAB88538, EAZ39844, AAZ06658, CAA68190, CAA52019 y BAC84377

Acil-CoA reductasas grasas apropiadas para uso con los microbios y métodos de la invención incluyen sin limitación aquellas enlistadas en la tabla 7.

Tabla 7. Acil-CoA reductasas grasas enlistadas por números de acceso de Gen Bank

NP_187805, ABO14927, NP_001049083, CAN83375, NP_191229, EAZ42242, EAZ06453, CAD30696, BAD31814, NP_190040, AAD38039, CAD30692, CAN81280, NP_197642, NP_190041, AAL15288 y NP_190042

Aldehído descarbonilasas grasas apropiadas para uso con los microbios en métodos de la invención incluyen sin limitación aquellas enlistadas en la tabla 8.

Tabla 8. Aldehído descarbonilasas grasas enlistadas por números de acceso Gen Bank.

NP_850932, ABN07985, CAN60676, AAC23640, CAA65199, AAC24373, CAE03390, ABD28319, NP_181306, EAZ31322, CAN 63491, EAY94825, EAY86731, CAL55686, XP_001420263, EAZ23849, NP_20058, NP_001063227, CAN83072, AAR90847 y AAR97643

Combinaciones de acil-ACP tioesterasas grasas co-expresadas naturalmente y proteínas portadoras de acilo son apropiadas para uso con los microbios y métodos de la invención.

Ejemplos adicionales de enzimas de modificación de hidrocarburos incluyen secuencias de aminoácidos contenidas en o a las que se hace referencia en o codificadas por secuencias de ácidos nucléicos contenidas o a las que se hace referencia en cualquiera de las siguientes patentes estadounidenses: 6,610,527; 6,451,576; 6,429,014; 6,342,380; 6,265,639; 6,194,185; 6,114,160; 6,083,731; 6,043,072; 5,994,114; 5,891,697; 5,871,988; 6,265,639 y descritos adicionalmente en números de acceso Gen Bank: AAO18435; ZP_00513891; Q38710; AAK60613, AA60610; AAK60611; NP_113747; CAB75874; AAK60612; AAF20201; BAA11024; AF20591 y CAA03710.

Otras enzimas apropiadas para uso con los microbios y

los métodos de la invención incluyen aquellas que tienen por lo menos 70% de identidad de aminoácido con una de las proteínas enlistadas en la tabla 5-8 y que exhiben la actividad enzimática deseada correspondiente (por ejemplo, escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilo, reducción de una acil-CoA a un aldehído o un alcohol o conversión de un aldehído a un alcano). En modalidades adicionales, la actividad enzimática está presente en una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99% de identidad con una de las secuencias descritas anteriormente, todas las cuales son incorporadas en la presente por referencia como si se resumieran plenamente.

Las enzimas de modificación de hidrocarburos descritas anteriormente son útiles en la producción de varios hidrocarburos a partir de un microbio (por ejemplo, una microalga, una levadura oleaginosa u hongo) o población de microbios, mediante lo cual una acil-ACP tioesterasa grasa escinde un ácido graso de una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis del lípido. Por medio de tratamiento enzimático adicional, el acido graso escindido es luego combinado con una co-enzima para producir una molécula de acil-CoA. Este acil-CoA es el sustrato para la actividad enzimática de una acil-CoA reductasa grasa para producir un aldehído,

también como para una acil-CoA/aldehído reductasa grasa para producir un alcohol. El aldehído producido por la acción de la acil-CoA reductasa grasa identificado anteriormente es el sustrato para actividad enzimática adicional ya sea por un aldehído reductasa grasa para producir un alcohol o un aldehído descarbonilasa grasa para producir un alcano o alqueno.

Las enzimas de modificación de hidrocarburo tienen especificidad para actuar sobre un sustrato que incluye un número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, una acil-ACP tioesterasa grasa puede tener especificidad para escindir un ácido graso que tiene 12 átomos de carbono de la ACP. Por consiguiente, en varias modalidades, el microbio puede contener un gen exógeno que codifica una proteína con especificidad para satelizar una actividad enzimática (por ejemplo, escisión de un ácido graso de una ACP, reducción de una acil-CoA a un aldehído o un alcohol o conversión de un aldehído a un alcano) con respecto al número de átomos de carbono contenidos en el sustrato. La especificidad enzimática puede ser en varias modalidades por un sustrato que tiene de 8 a 34 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 14 átomos de carbono y más preferiblemente de 10 a 14 átomos de carbono. La especificidad más preferida es por un sustrato que tiene 12 átomos de carbono. En otras modalidades, la especificidad puede ser por 20 a 30 átomos de carbono.

En algunas modalidades, ácidos grasos o los alcoholes

primarios correspondientes, aldehídos, alcanos o alquenos, generados por los métodos descritos en la presente, contienen por lo menos aproximadamente 8, por lo menos aproximadamente 10, por lo menos aproximadamente 12, por lo menos aproximadamente 14, por lo menos aproximadamente 16, por lo menos aproximadamente 18, por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 22, por lo menos aproximadamente 24, por lo menos aproximadamente 26, por lo menos aproximadamente 28, por lo menos aproximadamente 30, por lo menos aproximadamente 32 o por lo menos aproximadamente 34 de átomos de carbono o más. Ácidos grasos preferidos para la producción de biodiesel, diesel renovable o combustible de jet o los alcoholes primarios correspondientes, aldehídos, alcanos y alquenos para aplicaciones industriales contienen por lo menos aproximadamente 8 átomos de carbono o más. En ciertas modalidades, los ácidos grasos anteriores, también como la otras moléculas de hidrocarburo correspondientes están saturados (sin ningún doble o triple enlace carbono carbono); mono-insaturado (un solo doble enlace); poliinsaturados (dos o más dobles enlaces); son lineales (no cíclicos) y/o tienen poca o ninguna ramificación en sus estructuras.

Al seleccionar la combinación deseada de genes exógenos a ser expresados, se puede confeccionar el producto generado por el microbio, que puede luego ser extraído de la biomasa acuosa. Por ejemplo, el microbio puede contener: i) un

gen exógeno que codifica una acil-ACP tioesterasa grasa y opcionalmente ii) una proteína portadora de acilo co-expresada naturalmente o una proteína portadora de acilo que tiene de otra manera actividad por la acil-ACP tioesterasa grasa (o inversamente) y opcionalmente iii) un gen exógeno que codifica una acil-CoA/aldehído reductasa grasa o una acil-CoA reductasa grasa y opcionalmente iv)un gen exógeno que codifica una aldehído reductasa grasa o una aldehído descarbonilasa grasa. El microbio, cuando es cultivado como se describe posteriormente en la presente, sintetiza un ácido graso enlazado a una ACP y la acil-ACP tioesterasa grasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP para producir, por medio de procesamiento enzimático adicional, una molécula de acil-CoA grasa. Cuando está presente, la acil-CoA/aldehído reductasa grasa cataliza la reducción de la acil-CoA a un alcohol. Similarmente, la acil-CoA reductasa grasa, cuando está presente, cataliza la reducción de la acil-CoA a un aldehído. En aquellas modalidades en las cuales un gen exógeno que codifica una acil-CoA reductasa grasa está presente y es expresada para producir un producto de aldehído, una aldehído reductasa grasa, codificada por el tercer gen exógeno, cataliza la reducción del aldehído a un alcohol. Similarmente, una aldehído descarbonilasa grasa cataliza la compresión del aldehído a un alcano o un alqueno, cuando está presente.

Genes que codifican tales enzimas pueden ser

obtenidos de células que ya se sabe que exhiben producción de lípidos significativas tales como Chlorella protothecoides. Los genes ya conocidos que tienen un papel en la producción de lípidos, por ejemplo, un gen que codifica una enzima que satura dobles enlaces, puede ser transformado individualmente a células receptoras. Sin embargo, para la práctica de la invención no es necesario hacer suposiciones a priori en cuanto a cuáles genes son requeridos. Una biblioteca de ADN que contiene diferentes genes, tales como cADN de un organismo de producción de lípidos bueno, puede ser transformada a células receptoras. El cADN está preferiblemente en enlace operable con un promotor activo en microalgas. Diferentes células de microalgas receptoras transformadas por una biblioteca reciben diferentes genes de la biblioteca. Transformantes que tienen producción de lípido mejorada son identificados por medio de métodos de selección conocidos en el arte, tales como por ejemplo ácido HPLC, cromatografía de gases y métodos de espectometría de masas de análisis de hidrocarburo (para ejemplos de tales análisis, véase Biomass and Bioenergy Vol. 6. No. 4. pp. 269-274 (1994); Experientia 38; 47-49 (1982); y Phytochemistry 65 (2004) 3159-3165). Estos transformantes son luego sometidos a transformación adicional con la biblioteca original y/o inter-cruzados opcionalmente para generar una ronda adicional de organismos que tienen producción de lípidos mejorada. Procedimientos generales para desarrollar organismos

enteros para adquirir una propiedad deseada son descritos en por ejemplo Patente Estadounidense 6,716,631. Tales métodos abarcan, por ejemplo introducir una biblioteca de fragmentos de ADN a una pluralidad de células, mediante lo cual por lo menos uno de los fragmentos sufre recombinación con un segmento en el genoma o un episoma de las células para producir células modificadas. Las células modificadas son luego seleccionadas en cuanto a células modificadas que han evolucionado hacia la adquisición de la función deseada. Vectores y métodos para transformación son análogos a aquéllos discutidos en relación con la expresión de genes de lipasa.

Además, se pueden usar bibliotecas sustractivas para identificar genes cuya transcripción es inducida bajo condiciones diferentes, especialmente condiciones empleadas en el cultivo de microorganismos para la producción de biodiesel o para la producción de hidrocarburos útiles como una materia prima de alimentación para aplicaciones industriales. Las bibliotecas sustractivas contienen secuencias de nucleótidos que reflejan la diferencia entre dos muestras diferentes. Tales bibliotecas son preparadas mediante procedimientos que incluyen las etapas de desnaturalización e hibridización de poblaciones de nucleótidos (por ejemplo mARN, cADN, secuencias amplificadas) de cada muestra. Las secuencias comunes a ambas muestras se hibridizan y son removidas, dejando las secuencias que difieren entre las muestras. De esta manera, las secuencias

que son inducidas bajo condiciones particulares pueden ser identificadas. Esta técnica puede ser empleada, por ejemplo para identificar genes útiles para incrementar la producción de lípido (por ejemplo, ácido graso) y en particular producción de lípido bajo cualesquier condiciones de cultivo deseadas. La técnica de hibridización sustractiva puede también ser empleada para identificar promotores, por ejemplo, promotores inducibles útiles en la expresión de constructos de acuerdo con la invención.

Así, por ejemplo, bibliotecas sustractivas pueden ser preparadas a partir de cultivos de microorganismos cultivados autotrópicamente (en la luz sin una fuente de carbono fija) o heterotrópicamente (en la oscuridad en presencia de una fuente de carbono fija). En particular, los genes heterotrópicos pueden ser inducidos durante el cultivo en la oscuridad en presencia de una fuente de carbono fija y pueden por consiguiente estar presentes en una biblioteca acelerada al sustraer secuencias de células autotróficas de secuencias de células heterotrópicas oscuras. Bibliotecas sustractivas pueden también ser preparadas a partir de cultivos a los cuales un sustrato de carbono particular, tal como glucosa, ha sido agregado para identificar genes que juegan un papel en metabolizar el sustrato. Bibliotecas sustractivas preparadas a partir de cultivos cultivados en presencia de nitrógeno en exceso contralimitado pueden ser usadas para identificar genes

que controlan la división celular en contraposición a la producción de acumulación de hidrocarburo. La preparación de una biblioteca sustractiva de un cultivo al cual lípidos (por ejemplo, ácidos grasos) han sido agregados puede ayudar a identificar genes cuya sobreexpresión implementa la producción de ácido graso. Más específicamente, la adición de ácidos grasos a un cultivo de células que pueden usar los ácidos grasos agregados conducirá a la regulación descendente de genes sintéticos de ácido graso para regular descendentemente la producción de ácido graso. La sobreexpresión de uno o más de tales genes tendrá el efecto opuesto.

B. Flujo de Carbono Incrementado a la Ruta del Lípido.

Algunas microalgas producen cantidades significativas de metabolitos sin lípidos, tales como, por ejemplo, polisacáridos. Debido a que la biosíntesis de polisacáridos puede usar una proporción significativa de la energía metabólica total disponible a las células, la mutagénesis de células productoras de lípidos seguida por selección en cuanto a producción de polisacáridos reducida o eliminada genera nuevas cepas que son capaces de producir rendimientos más altos de lípidos.

El análisis de fenol: ácido sulfúrico detecta carbohidratos (véase, Hellebust, Handbook of Phycological Methods, Cambridge University Press, 1978; y Cuesta G., et al.,

J Microbiol Methods. 2003 Jan;52(l):69-73). El análisis de azul de 1,6-dimetilmetileno detecta polisacáridos aniónicos, (véase, por ejemplo Braz J Med Biol Res. 1999 May;32(5):545-50; Clin Chem. 1986 Nov;32(l l):2073-6).

Los polisacáridos pueden también ser analizados por medio de métodos tales como HPLC, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio aniónico (véase, por ejemplo Prosky L, Asp N, Schweizer TF, DeVries JW & Furda I (1988). Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in food and food products: Interlaboratory study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 71, 1017±1023; Int J Biol Macromol. 2003 Nov;33(l-3):9- 18). Los polisacáridos también pueden ser detectados utilizando electroforésis de gel (véase, por ejemplo Anal Biochem. 2003 Oct 15;321(2):174-82; Anal Biochem. 2002 Jan l;300(l):53-68).

VI. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN DE LÍPIDOS E HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos) producidos por la célula de la invención pueden ser cosechados o recolectados de otra manera mediante cualquier medio conveniente. Por ejemplo, los hidrocarburos secretados de células pueden ser centrifugados para separar los hidrocarburos en una capa hidrofóbica de contaminantes en una capa acuosa y opcionalmente de cualesquier materiales sólidos como un precipitado después

de la centrifugación. El material que contiene células o fracciones de células puede ser tratado con proteasas para degradar proteínas contaminantes antes o después de la centrifugación. En algunas instancias las proteínas contaminantes están asociadas, posiblemente de manera covalente a hidrocarburos o precursores de hidrocarburos que forman hidrocarburos después de la remoción de la proteína. En otras instancias, las moléculas de hidrocarburo están en una preparación que también contienen proteínas. Se pueden agregar proteasas a preparaciones de hidrocarburos que contienen proteínas para degradar proteínas (por ejemplo, la proteasa de Streptomyces griseus puede ser usada (SigmaAldrich catalog number P5147)). Después de la digestión, los hidrocarburos son preferiblemente purificados de proteínas residuales, fragmentos de péptidos y aminoácidos. Esta purificación se puede llevar a cabo, por ejemplo mediante métodos enlistados anteriormente, tales como centrifugación y filtración.

Hidrocarburos extracelulares pueden también ser extraídos in vivo de células de microalgas vivientes que son luego devueltas a un birreactor mediante exposición de las células en un medio ambiente de otra manera estéril, a un solvente de extracción no tóxico, seguido por la separación de la células vivientes y la fracción hidrofóbica del solvente de extracción e hidrocarburos, en donde las células vivientes separadas son luego devueltas a un recipiente de cultivo, tal

como un fermentador de acero inoxidable o fotobioreactor (véase, Biotechnol Bioeng. 2004 Dec 5;88(5):593-600 and Biotechnol Bioeng. 2004 Mar 5;85(5):475-81).

Los hidrocarburos pueden también ser aislados mediante extracción de célula entera. Las células son primero sometidas a disrupción, como se describe en la sección intitulada "Lisis de Células" y luego los hidrocarburos asociados a la membrana celular/pared celular intracelulares también como hidrocarburos extracelulares pueden ser recolectados de toda la masa celular tal como mediante el uso de centrifugación como se describe anteriormente.

Varios métodos están disponibles para separar hidrocarburos y lípidos de lisados celulares producidos por los métodos anteriores. Por ejemplo, los hidrocarburos pueden ser extraídos con un solvente hidrofóbico tal como hexano (véase, por ejemplo Frenz et al. 1989, Enzyme Microb. Technol., 11 :717). Los hidrocarburos pueden también ser extraídos usando licuefacción (véase, por ejemplo Sawayama et al. 1999, Biomass and Bioenergy 17:33-39 y Inoue et al. 1993, Biomass Bioenergy 6(4):269-274); licuefacción de aceite (véase, por ejemplo Minowa et al. 1995, Fuel 74(12):1735-1738); y extracción de CO_2 supercrítico (véase, por ejemplo Mendes et al. 2003, Inorganica Chimica Acta 356:328-334).

Miao y Wu describen un protocolo para la recuperación del lípido microalgal de un cultivo de Chlorella

protototheocoides en el cual las células fueron cosechadas mediante centrifugación, lavadas con agua destilada y secada mediante secado por congelación. El polvo celular resultante fue pulverizado en un mortero y luego extraído con n-hexano. Miao and Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846.

A. Lisis de Células

Los lípidos intracelulares e hidrocarburos producidos en microorganismos son en algunas modalidades extraídos después de las lisis de las células del microorganismo. Una vez extraídos, los lípidos y/o hidrocarburos pueden ser refinados adicionalmente para producir aceites, combustibles u oleoquímicos.

Después de la consumación del cultivo, los microorganismos pueden ser separados del caldo de fermentación. Opcionalmente, la separación es efectuada mediante centrifugación para generar una pasta concentrada. La centrifugación no remueve cantidades significativas de agua intracelular de los microorganismos y no es una etapa de secado. La biomasa puede luego ser lavada con una solución de lavado (por ejemplo, agua DI) para deshacerse del caldo de fermentación y desechos. Opcionalmente, la biomasa microbiana lavada puede también ser secada (secada en horno, liofilizada, etc.) antes de la disrupción celular. Alternativamente, las células pueden ser sometidas a lisis sin separación de algo o

todo del caldo de fermentación cuando la fermentación está completa. Por ejemplo, las células pueden estar a una proporción de menos de 1:1 v:v de células a líquido extracelular cuando las células son sometidas a lisis.

Los microorganismos que contienen un lípido y/o hidrocarburo pueden ser sometidos a lisis para producir un lisado. Como se detalla en la presente, la etapa de lisis de un microorganismo (también denominada como lisis celular) puede ser obtenida mediante cualquier medio conveniente, en los que se incluyen lisis inducida por calor, adición de una base, adición de un ácido, utilizando enzimas tales como proteasas y enzimas de degradación de polisacárido tales como amilasas, utilizando ultrasonido, lisis mecánica, utilizando choque osmótico, infección con un virus lítico y/o expresión de uno o más genes líticos. La lisis es efectuada para liberar moléculas intracelulares que han sido producidas por el microorganismo. Cada uno de estos métodos para la lisis de un microorganismo pueden ser usados como un solo método o en combinación simultánea o secuencialmente.

La extensión de disrupción celular puede ser observada por análisis de microscopio. Utilizando uno o más de los métodos descritos en la presente, comúnmente más del 70% de ruptura celular se observa. Preferiblemente la ruptura celular es más del 80%, más preferiblemente más del 90% y más preferiblemente alrededor de 100%.

En modalidades particulares, el microorganismo es sometido a lisis después del cultivo, por ejemplo para incrementar la exposición del lípido celular y/o hidrocarburo para extracción o procesamiento adicional. La sincronización de expresión de lipasa (por ejemplo, vía un promotor inducible) o lisis celular puede ser ajustada para optimizar el rendimiento de lípidos y/o hidrocarburos. A continuación se describen un número de técnicas de lisis. Estas técnicas pueden ser usadas individualmente o en combinación.

1. Lisis inducida térmicamente

En una modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende calentamiento de una suspensión celular que contiene el microorganismo. En esta modalidad, el caldo de fermentación que contiene los microorganismos (o una suspensión de microorganismos aislados del caldo de fermentación) es calentado hasta que los microorganismos, esto es, las membranas y paredes celulares de los microorganismos se degradan o rompen. Comúnmente, las temperaturas aplicadas son de por lo menos 50°C. Temperaturas más altas, tales como, por lo menos 30°C, por lo menos 60°C, por lo menos 70°C, por lo menos 80°C, por lo menos 90°C, por lo menos 100°C, por lo menos 110°C, por lo menos 120°C, por lo menos 130°C o más altas son usadas para la lisis celular más eficiente.

La lisis de células mediante tratamiento térmico puede ser efectuada al someter a ebullición el microorganismo. Alternativamente, se puede efectuar tratamiento térmico (sin ebullición) en un autoclave. Luego el lisado tratado térmicamente puede ser enfriado para tratamiento adicional.

La disrupción celular puede también ser efectuada mediante tratamiento por vapor saturado, esto es, por medio de la adición de vapor presurizado. El tratamiento por vapor saturado de microalgas para disrupción celular se describe por ejemplo en la Patente Estadounidense 6,750,048.

2. Lisis Utilizando una Base

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende agregar una base a una suspensión celular que contiene el microorganismo.

La base debe ser lo suficientemente fuerte para hidrolizar por lo menos una porción de los compuestos proteináceos de los microorganismos usados. Las bases que son útiles para solubilizar proteínas son conocidos en el arte de química. Bases ejemplares que son útiles en los métodos de la presente invención incluyen pero no están limitados a hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de litio, sodio, potasio, calcio y mezclas de los mismos. Una base preferida es KOH. El tratamiento por base de microalgas para disrupción celular se describe por ejemplo en la Patente Estadounidense 6,750,048.

3. Lisis Ácida

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende agregar un ácido a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La lisis ácida puede ser efectuada utilizando un ácido a una concentración de 10-500 nN o preferiblemente 40-160 nM. La lisis ácida es preferiblemente efectuada a una temperatura mayor que la temperatura ambiente (por ejemplo, a 40-160°C y preferiblemente a una temperatura de 50-130°C). Para temperaturas moderadas (por ejemplo, temperatura ambiente a 100°C y particularmente temperatura ambiente a 65°), el tratamiento ácido puede ser combinado útilmente con sonificación u otros métodos de disrupción celular.

4. Lisis de Células Utilizando Enzimas

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende someter a lisis el microorganismo al usar una enzima. Enzimas preferidas para someter a lisis un microorganismo son proteasas y enzimas degradantes de polisacáridos tales como hemicelulasa (por ejemplo, hemicelulasa de Aspergillus niger; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #H2125), pectinasa, (por ejemplo, pectinasa de Rhizopus sp.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #P2401), Mannaway 4.0 L (Novozymes), celulasa (por ejemplo, celulosa de Trichoderma viride; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #C9422), y

driselasa (por ejemplo driselasa de Basidiomycetes sp.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #D9515.

a) Celulasa

En una modalidad preferida de la presente invención, una celulasa para lisis de un microorganismo es una enzima polisacárido-degradante, opcionalmente de Chlorella o un virus de Chlorella.

b) Proteasas

Proteasas tales como proteasa de Estreptomisis grisis, quimiotripsina, proteinasa K, proteasas enlistadas en Degradation of Polylactide by Commercial Proteases, Oda Yet al., Journal of Polymers and the Environment, Volume 8, Number 1, January 2000 , pp. 29-32(4), y otras proteasas pueden ser usadas para someter a lisis microorganismos. Otras proteasas que pueden ser usadas incluyen Alcalase 2.4 FG (Novozymes) and Flavourzyme 100 L (Novozymes).

c) Combinaciones

Cualquier combinación de una proteasa y una enzima polisacárido-degradante pueden también ser usadas, en las que se incluyen cualquier combinación de las proteasas precedentes y enzimas polisacáridos-degradantes.

5. Lisis de Células Utilizando Ultrasonido

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo se lleva a cabo al utilizar ultrasonido, esto es, sonificación. Así, las células pueden también ser sometidas a lisis con sonido de alta frecuencia. El sonido puede ser producido electrónicamente y transportado por medio de una junta metálica a una suspensión celular concentrada apropiadamente. Esta sonificación (o ultrasonificación) disrumpe la integridad celular en base a la creación de cavidades en la suspensión celular.

6. Lisis mecánica

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo es efectuada mediante lisis mecánica. Las células pueden ser sometidas a lisis mecánicamente y opcionalmente homogeneizadas para facilitar la recolección de hidrocarburos (por ejemplo, lípidos). Por ejemplo, un dispositivo de disruptor a presión puede ser usado para bombear una suspensión que contiene células a través de una válvula de orificio restringida. Se aplica alta presión (hasta 1500 bars) seguido por una expansión instantánea a través de una boquilla de salida. La disrupción celular se lleva a cabo mediante tres mecanismos diferentes: choque sobre la válvula, alto esfuerzo cortante de líquido en el orificio y caída de presión repentina en la descarga, provocando una

explosión de la célula. El método libera moléculas intracelulares.

Alternativamente, se puede usar un molino de bolas. En un Molino de bolas, las células son agitadas en suspensión con partículas abrasivas pequeñas, tales como perlas. Las células se rompen debido a las fuerzas cortantes, molienda entre las perlas y colisiones con perlas. Las perlas someten a disrupción las células para liberar el contenido celular. Las células pueden también ser sometidas a disrupción por fuerzas cortantes, tal como con el uso de mezcla (tal como con un mezclador a alta velocidad o mezclador Waring como ejemplos), la prensa francesa o aun centrifugación en el caso de paredes celulares débiles para someter a disrupción las células.

7. Lisis de células mediante choque osmótico (citólisis)

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo es efectuada mediante la aplicación de un choque osmótico.

8. Infección con un virus lítico

En una modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende infección de microorganismos con un virus lítico. Se conocen una amplia variedad virus para someter a lisis microorganismos apropiados

para uso en la presente invención y la selección y uso de un virus lítico particular para un microorganismo particular está dentro del nivel de habilidad de aquellos experimentados en el arte.

Por ejemplo, el virus de *Paramecium bursaria chlorella* (PBCV-1) es el prototipo de un grupo de virus de ADN de doble hebra grandes, eicosaedrales, formadores de placas (Familia Phyconaviridae, género Chlorovirus) que se replican en y someten a lisis ciertas algas verdes semejantes a *Chlorella* eucariónticas unicelulares. Así, cualquier microalga susceptible puede ser sometida a lisis al infectar el cultivo con un virus de *Chlorella* apropiado. Métodos para infectar especies de *Chlorella* con un virus de chlorella son conocidos. Véase, por ejemplo, *Adv. Virus Res.* 2006: 293-336; *Virology*, 25 de abril de 1999, 257(1): 15-23; *Virology*, 5 de enero de 2004, 318(1): 214-23; *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2000(44): 161-2; *J. Virol.*, marzo de 2006, 80(5): 2437-44 y *Annu. Rev. Microbiol.* 1999, 53: 447-94.

9. Autólisis (expresión de un gen lítico)

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende autolisis. En esta modalidad, un microorganismo de acuerdo con la invención es diseñado genéticamente para producir una proteína lítica que

someterá a lisis el microorganismo. Este gen lítico puede ser expresado utilizando un promotor inducible, de tal manera que las células pueden primero ser cultivadas a una densidad deseable en un fermentador, seguido por la inducción del promotor para expresar el gen lítico para someter a lisis las células. En una modalidad, el gen lítico codifica una enzima degradante de polisacáridos.

En ciertas otras modalidades, el gen lítico es un gen de un virus lítico. Así, por ejemplo, un gen lítico de un virus de Chlorella puede ser expresado en una célula de alga del género *Chlorella* tal como *C. protothecoides*.

Métodos de expresión apropiados son descritos en la presente con respecto a la expresión de un gen de lipasa. La expresión de genes líticos se hace preferiblemente utilizando un promotor inducible, tal como un promotor activo en microalgas que es inducido mediante un estímulo tal como la presencia de una molécula pequeña, luz, calor y otros estímulos. Genes líticos de virus de chlorella son conocidos. Por ejemplo, véase *Virology* 263, 376-387 (1999) y *Virology* 230, 361-368 (1997).

B. Extracción de lípidos e hidrocarburos

Los lípidos e hidrocarburos generados por los microorganismos de la presente invención pueden ser recuperados mediante extracción con un solvente orgánico. En algunos casos, el solvente orgánico preferido es hexano. Comúnmente, el

solvente orgánico es agregado directamente al lisado sin separación previa de los componentes del lisado. En una modalidad el lisado generado por uno o más de los métodos descritos anteriormente es puesto en contacto con un solvente orgánico por un período de tiempo suficiente para permitir que los componentes de lípido y/o hidrocarburo formen una solución con el solvente orgánico. En algunos casos, la solución puede luego ser refinada adicionalmente para recuperar componentes de lípidos o hidrocarburos deseados específicos. Métodos de extracción por hexano son bien conocidos en el arte.

VII. MÉTODOS PARA EL PROCESAMIENTO DE LÍPIDOS E HIDROCARBUROS

A. Modificación enzimática

Los hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alboholes y alcanos) producidos por las células como se describe en la presente pueden ser modificados mediante el uso de una o más enzimas, en las que se incluyen una lipasa, como se describe anteriormente. Cuando los hidrocarburos están en el medio ambiente extracelular de la célula, la una o más enzimas pueden ser agregadas a aquel medio ambiente bajo condiciones en las cuales la enzima modifica el hidrocarburo o completa su síntesis de un precursor de hidrocarburo. Alternativamente, los hidrocarburos pueden estar parcial o completamente aislados del material celular antes de la adición de uno o más catalizadores tales como enzimas. Tales

catalizadores son agregados exógenamente y su actividad ocurre al exterior de la célula o *in vitro*.

B. Modificación térmica y otra modificación catalítica

Los hidrocarburos producidos por células *in vivo* o modificados enzimáticamente *in vitro*, como se describe en la presente, pueden ser procesados además opcionalmente mediante medios convencionales. El procesamiento puede incluir "pirolisis catalítica" para reducir el tamaño y así incrementar la composición de hidrógeno:carbono de moléculas de hidrocarburo. Métodos de pirolisis catalítica y térmica son usados sistemáticamente en el procesamiento de hidrocarburos y aceite de triglicéridos. Los métodos catalíticos involucran el uso de un catalizador, tal como un catalizador ácido sólido. El catalizador puede ser sílice-alúmina o una zeolita, que da como resultado un rompimiento heterolítico o asimétrico de un enlace carbono-carbono para dar como resultado un carbocatión y un anión hidruro. Estos intermediarios activos sufren luego ya sea reacomodo o transferencia de hidruro con otro hidrocarburo. Las reacciones pueden así regenerar los intermediarios para dar como resultado un mecanismo de cadena de auto-propagación. Los hidrocarburos pueden también ser procesados para reducir, opcionalmente a cero, el número de dobles, triples enlaces carbono-carbono en los mismos. Los hidrocarburos pueden también ser procesados para remover o eliminar un anillo o estructura

cíclica en los mismos. Los hidrocarburos pueden también ser procesados para incrementar la proporción de hidrógeno:carbono. Esto puede incluir la adición de hidrógeno ("hidrogenación") y/o la "pirolisis catalítica" de hidrocarburos a hidrocarburos más pequeños.

Los métodos térmicos involucran el uso de temperatura y presión elevadas para reducir el tamaño de hidrocarburos. Se pueden usar una temperatura elevada de aproximadamente 800° C y una presión de aproximadamente 700 kPa. Estas condiciones generan "ligero", un término que a veces es usado para referirse a moléculas de hidrocarburo ricas en hidrógeno (tal como son distinguidas del flujo de fotones), en tanto que también generan, mediante condensación, moléculas de hidrocarburo pesadas que están relativamente agotadas de hidrógeno. La metodología proporciona rompimiento homolítico o simétrico y produce alquenos que pueden opcionalmente ser saturados enzimáticamente como se describe anteriormente.

Los métodos catalíticos y térmicos son convencionales en plantas para el procesamiento de hidrocarburos y refinación del petróleo. Así, los hidrocarburos producidos por las células como se describe en la presente pueden ser recolectados y procesados por refinados a través de medios convencionales. Véase Hillen et al. (Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIV: 193-205 (1982)) para un reporte de hidrocraking de hidrocarburos producidos por microalgas. En modalidades

alternativas, la fracción es tratada con otro catalizador, tal como un compuesto orgánico, calor y/o un compuesto inorgánico. Para el procesamiento de lípidos a biodiesel, se usa un proceso de transesterificación como se describe en la Sección IV en la presente.

Los hidrocarburos producidos vía los métodos de la presente invención son útiles en una variedad de aplicaciones industriales. Por ejemplo, la producción de alquilbencensulfonato lineal (LAS), un surfactante aniónico usado en casi todos los tipos de detergentes y preparaciones de limpieza, utiliza hidrocarburos que comprenden en general una cadena de 10-14 átomos de carbono. Véanse, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 6,496,430; 5,506,201; 6,692,730; 6,268,517; 6,020,509; 6,140,302; 5,080,848 y 5,567,359. Surfactantes, tales como LAS, pueden ser usados en la manufactura de composiciones para el cuidado personal y detergentes, tales como aquellos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,942,479; 6,086,903; 5,833,955 y 6,407,044.

VIII. MÉTODOS PARA PRODUCIR COMBUSTIBLES APROPIADOS PARA USO EN VEHÍCULOS A DIESEL Y MOTORES A CHORRO

El interés incrementado es dirigido al uso de componentes de hidrocarburos de origen biológico en combustible, tales como biodiesel, diesel renovable y

combustible de jet, puesto que los materiales biológicos renovables de partida que pueden reemplazar los materiales de partida derivados de combustibles fósiles están disponibles y es deseable el uso de los mismos. Hay una necesidad urgente por métodos para producir componentes de hidrocarburos a partir de materiales biológicos. La presente invención satisface esta necesidad al proveer métodos para la composición de biodiesel, diesel renovable y combustible de jet utilizando los lípidos generados por los métodos descritos en la presente como material biológico para producir biodiesel, diesel renovable y combustible de jet.

Los combustibles de diesel tradicionales son destilados de petróleo ricos en hidrocarburos parafínicos. Tienen intervalos de ebullición tan amplios como de 188° C (370° F) a 415.5° C (780° F), que son apropiados para combustión en un motor de inhibición por compresión, tal como un vehículo de motor a diesel. La Sociedad Estadounidense de Pruebas y Materiales (ASTM por sus siglas en inglés) establece el grado de diesel de acuerdo con el intervalo de ebullición, junto con intervalos permisibles de otras propiedades de combustible, tales como número de cetanos, punto de turbidez, temperatura de inflamación, viscosidad, punto de anilina, contenido de azufre, contenido de agua, contenido de ceniza, corrosión de banda de cobre y residuos de carbono. Técnicamente, cualquier material destilado de hidrocarburos

derivado de biomasa o que cumple de otra manera con la especificación de ASTM apropiada puede ser definido como combustible diesel (ASTM D975), combustible de jet (ASTM D1655) o como biodiesel (ASTM D6751).

Después de la extracción, los componentes de lípido y/o hidrocarburo recuperados de la biomasa microbiana descritos en la presente pueden ser sometidos a tratamiento químico para la manufactura de un combustible para uso en vehículos a diesel y motores a chorro.

A. Biodiesel

El biodiesel es un líquido que varía en color – entre dorado y café oscuro – dependiendo de la materia prima de alimentación de producción. Es prácticamente inmiscible con agua, tiene un alto punto de ebullición y una baja presión de vapor. Biodiesel se refiere a un combustible procesado equivalente a diesel para uso en vehículos de motor a diesel. El biodiesel es biodegradable y no tóxico. Un beneficio adicional del biodiesel con respecto al combustible diesel convencional es un desgaste más bajo del motor.

Comúnmente, el biodiesel comprende alquilésteres de C_{14}-C_{18}. Tales procesos convierten la biomasa o un lípido producido y aislado como se describe en la presente a combustibles de diesel. Un método preferido para producir biodiesel es mediante transesterificación de un lípido como se

describe en la presente. Un alquiléster preferido para uso como biodiesel es un metiléster o etiléster.

El biodiesel producido por un método descrito en la presente puede ser usado solo o combinado con combustible diesel convencional a cualquier concentración en la mayoría de los vehículos de motor a diesel modernos. Cuando es combinado con el combustible diesel convencional (diesel de petróleo), el biodiesel puede estar presente de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 99.9%. A nivel mundial se utiliza un sistema conocido como el factor "B" para afirmar la cantidad de biodiesel en cualquier mezcla de combustible. Por ejemplo, el combustible que contiene 20% de biodiesel es etiquetado como D20. El biodiesel puro es denominado como B100.

El biodiesel puede también ser usado como un combustible de calentamiento en calentadores domésticos y comerciales. Los calentadores o calderas de aceite existentes pueden contener partes de hule o caucho y pueden requerir conversión para funcionar con biodiesel. El proceso de conversión es de manera usual relativamente simple, que involucra el intercambio de partes de hule o caucho por partes sintéticas debido a que el biodiesel es un solvente fuerte. Debido a su fuerte poder de solvente, el quemado de biodiesel incrementará la eficiencia de las calderas o calentadores.

El biodiesel puede ser usado como aditivo en formaciones de diesel para incrementar la lubricidad de

combustible diesel de azufre ultra bajo puro (ULSD), que es ventajoso debido a que no tiene virtualmente ningún contenido de azufre.

El biodiesel es un mejor solvente que el petrodiesel y puede ser usado para romper depósitos de residuos en líneas de combustible de vehículos que han sido previamente puestos en operación con petrodiesel.

1. Producción de biodiesel

El biodiesel puede ser producido mediante transesterificación de triglicéridos contenidos en biomasa rica en aceite. Así, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir biodiesel. En una modalidad preferida, el método para producir biodiesel comprende las etapas de: (a) cultivar un microorganismo que contiene lípido utilizando los métodos revelados en la presente; (b) someter a lisis un microorganismo que contiene lípidos para producir un lisado; (c) aislar el lípido del microorganismo sometido a lisis y (d) transesterificar la composición del lípido, mediante lo cual se produce biodiesel.

Métodos para el cultivo de un microorganismo, someter a lisis un microorganismo para producir un lisado, tratar el lisado en un medio que comprende un solvente orgánico para formar una mezcla heterogénea y recuperar el lisado tratado a una composición de lípido han sido descritos anteriormente y

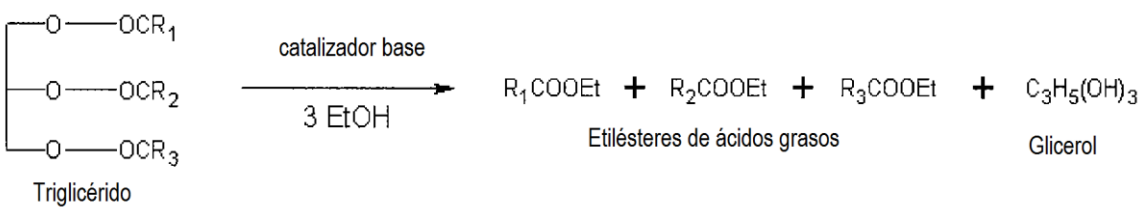
pueden también ser usados en el método para producir biodiesel.

Las composiciones de lípidos pueden ser sometidas a trasesterificación para producir ésteres de ácidos grasos de cadena larga útiles como biodiesel. Las reacciones de transesterificación preferidas son bosquejadas a continuación e incluyen transesterificación catalizada por base y transesterificación utilizando lipasas recombinantes.

En un proceso de transesterificación catalizado por base, los triacilglicéridos se hacen reaccionar con un alcohol, tal como metanol o etanol, en presencia de un catalizador alcalino, comúnmente hidróxido de potasio. Esta reacción forma metil o etilésteres o glicerina (glicerol) como producto secundario.

a) Proceso químico general

Aceites de animales y plantas están compuestos comúnmente de triglicéridos que son ésteres de ácidos grasos libres con el alcohol vinílico, glicerol. En la transesterificación, el glicerol en un triacilglicérido (TAG) es reemplazado con un alcohol de cadena corta tal como metanol o etanol. Un esquema d



En este esquema de reacción, el alcohol es desprotonado con una base para hacerlo un nucleófilo más fuerte. Comúnmente, se usa etanol o metanol en vasto exceso (hasta 50 veces). Normalmente, esta reacción procederá ya sea excesivamente lenta o no. calor, también como un ácido o base pueden ser usados para ayudar a que la reacción proceda más rápidamente. El ácido o base no son consumidos por la reacción de transesterificación, así no son reactivos si no catalizadores. Casi todo el biodiesel ha sido producido utilizando la técnica catalizada por base ya que requiere solamente bajar temperaturas y presiones y producen más de 98% de rendimiento de conversión (a condición de que el agente de partida sea bajo de humedad y ácidos grasos libres).

b. Uso de lipasas recombinantes

La transesterificación también se puede llevar a cabo experimentalmente utilizando una enzima, tal como una lipasa en lugar de una base. La transesterificación lipasa-catalizada se puede llevar a cabo, por ejemplo, a una temperatura de entre la temperatura ambiente y 80° C y una proporción molar de TAG al alcohol inferior mayor que 1:1, preferiblemente alrededor de 3:1.

Lipasas apropiadas para uso en la transesterificación incluyen pero no están limitadas a aquellas enlistadas en la

Tabla 9. Otros ejemplos de lipasas útiles para transesterificación se encuentran por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,798,793; 4,940,845; 5,156,963; 5,342,768; 5,776,741 y WO 89/01032.

Tabla 9. Lipasas apropiadas para uso en transesterificación.

Lipasa ABG73614 de *Aspergillus niger*, lipasa B CAA83122 de *Candida antárctica* (novozym-435), lipasa AAR24090 de *Candida cylindracea*, lipasa de *Candida lipolytica* (Lipasa L; Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), lipasa de *Candida rugosa* (por ejemplo, Lipasa-OF; Meito Sangyo Co., Ltd.), Lipasa de *Mucor mieheik* (Lipozima IM 20), lipasa AAA25882 de *Pseudomonas fluorescens*, lipasa AAAF32408 de *Rhizopus japonicus* (Lipasa F), lipasa ABI13521 de *Serratia marcescens* (Enzima SM), lipasa CAB58509 de *Thermomyces lanuginosa*, Lipasa P (Nagase ChemteX Corporation) y Lipasa QLM (Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya, Japón)

Un reto para usar una lipasa para la producción de ésteres de ácido graso apropiados para biodiesel es que el precio de la lipasa es mucho más alto que el precio del hidróxido de sodio (NaOH) usado por el proceso de base fuerte. Este reto ha sido tratado al utilizar una lipasa inmovilizada, que puede ser reciclada. Sin embargo, la actividad de la lipasa inmovilizada debe ser mantenida después de ser reciclada por un mínimo de ciclos para permitir que un proceso a base de lipasa compita con el proceso de base fuerte en términos de costo de producción. Las lipasas inmovilizadas son sometidas a

envenenamiento por los alcoholes inferiores usados comúnmente en la transesterificación. La Patente Estadounidense No. 6,398,707 (otorgada el 4 de junio de 2002 a Wu et al.) describe métodos para mejora la actividad de lipasas inmovilizadas y regenerar lipasas inmovilizadas que tienen actividad reducida.

En modalidades particulares, una lipasa recombinante es expresada en los mismos microorganismos que producen lípido sobre los cuales la lipasa actúa. Lipasas recombinantes apropiadas incluyen aquellas enlistadas anteriormente en la Tabla 9 y/o que tienen números de acceso de GenBank enlistados anteriormente en la Tabla 9 o un polipéptido que tiene por lo menos 70% de identidad de aminoácidos con una de las lipasas enlistadas anteriormente y en la tabla 9 y que exhibe actividad de lipasa. En modalidades adicionales, la actividad enzimática está presente en una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 99% de identidad con una de las secuencias descritas anteriormente, todas las cuales son incorporadas por referencia en la presente como si se resumieran plenamente. El ADN que codifica la lipasa y marcador seleccionable es preferiblemente cADN codón-optimizado. Métodos para recodificar genes para expresión en microalgas son descritos en la Patente Estadounidense No. 7,135,290.

2. Estándares

El estándar internacional común para biodiesel es EN 14214. D6751 de ASTM es el estándar de biodiesel más común al que se hace referencia en los Estados Unidos de América y Canadá. Alemania usa DIN EN 14214 y el Reino Unido de la Gran Bretaña requiere cumplimiento con BS EN 14214.

Pruebas industriales básicas para determinar si los productos se conforman a estos estándares incluyen comúnmente cromatografía de gases, HPLC y otros. El biodiesel que cumple con los estándares de calidad es muy no tóxico, con una clasificación de toxicidad o toxicidad nominal (LD_{50}) mayor de 50 mL/Kg.

B. Diesel renovable

El diesel renovable comprende alcanos, tales como C16:0 y C18:0 y así, son distinguibles del biodiesel. El diesel renovable de alta calidad se conforma al estándar de D975 de ASTM.

Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima de la invención para producir diesel renovable. Así, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir diesel renovable. El diesel renovable puede ser producido mediante por lo menos tres procesos: procesamiento hidrotérmico

(hidrotratamiento); hidroprocesamiento y licuefacción indirecta. Estos procesos producen destilados sin éster. Durante estos procesos, los triacilglicéridos producidos y aislados como se describe en la presente son convertidos a alcanos.

En una modalidad preferida, el método para producir diesel renovable comprende a) cultivar un microorganismo que contiene lípido utilizando métodos recomendados en la presente; b) someter a lisis el microorganismo para producir un lisado; c) aislar el lípido del microorganismo sometido a lisis y d) desoxigenar e hidrotratar el lípido para producir un alcano, mediante el cual se produce diesel renovable. Lípidos apropiados para la manufactura de diesel renovable pueden ser obtenidos vía extracción de biomasa microbiana utilizando un solvente orgánico tal como hexano o vía otros métodos, tales como aquellos descritos en la patente estadounidense 5, 928, 696.

En algunos métodos el lípido microbiano es primero sometido a pirolisis catalítica en conjunción con hidrotratamiento para reducir la longitud de cadena de carbonos y saturar los dobles enlaces, respectivamente. El material es luego isomerizado, también en conjunción con hidrotratamiento. La fracción de naphta puede luego ser removida por medio de destilación, seguida por destilación adicional para vaporizar y destilar componentes deseados en el combustible diesel para

cumplir con el estándar D975 en tanto que se dejan componentes que son más pesados que los deseados para cumplir con el estándar D975. Los métodos de hidrotratamiento, hidrocracking desoxigenación e isomerización de aceites modificados químicamente, en los que se incluyen aceites de triglicérido, son bien conocidos en el arte. Véanse, por ejemplo solicitudes de patente europeas EP1741768 (A1); EP1741767 (A1); EP1682466 (A1); EP1640437 (A1); EP1681337 (A1); EP1795576 (A1) y patentes estadounidenses 7, 238, 277; 6, 630, 066; 6, 596, 155; 6, 977, 322; 7,041, 866; 6,217, 746; 5, 885, 440; 6, 881, 873.

1. Hidrotratamiento

En una modalidad preferida del método para producir diesel renovable, el tratamiento de lípido para producir un alcano es efectuado mediante hidrotratamiento de la composición de lípido. En el procesamiento hidrotérmico, comúnmente, la biomasa se hace reaccionar en agua a una temperatura y presión elevadas para formar aceites y sólidos residuales. Las temperaturas de conversión son comúnmente de 149°C (300°F) a 349°C (660°F), con presión suficiente para mantener el agua principalmente como líquido, 100 a 170 atmósferas estándar (atm). Los tiempos de reacción son menores de 15 a 30 minutos. Después que la reacción está completa, los orgánicos son separados del agua. Mediante esto, se produce un destilado apropiado para diesel.

2. Hidroprocesamiento

Un diesel renovable, denominado como "diesel verde", puede ser producido a partir de ácidos grasos mediante tecnología de hidroprocesamiento tradicional. Los aceites que contienen triglicérido pueden ser hidroprocesados ya sea como co-alimentación con petróleo o como una alimentación dedicada. El producto es un combustible diesel que se conforma con la especificación D975 de la ASTM. Así, en otra modalidad preferida del método para producir diesel renovable, se efectúa el tratamiento de la composición de lípido para producir un alcano mediante hidroprocesamiento de la composición de lípido.

En algunos métodos para fabricar diesel renovable, la primera etapa de tratamiento de un triglicérido es hidroprocesamiento para saturar dobles enlaces, seguido por desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno y un catalizador. En algunos métodos, la hidrogenación y desoxigenación ocurren en la misma reacción. En otros métodos, la desoxigenación ocurre antes de la hidrogenación. La isomerización es luego efectuada opcionalmente, también en presencia de hidrógeno y un catalizador. Los componentes del naphta son preferentes separados por medio de destilación. Para ejemplo, véanse patentes estadounidenses 5,475,160 (hidrogenización de triglicéridos); 5,091,116 (desoxigenación, hidrogenación y remoción de gas); 6,391,815 (hidrogenación) y

5,888,947 (isomerización).

Los refinadores de petróleo utilizan antiguo procesamiento para remover impurezas mediante tratamiento de alimentaciones con hidrógeno. Las temperaturas de conversión de hidroprocesamiento son comúnmente de 149°C (300°F) a 361°C (700°F). Las presiones son comúnmente de 40 a 100 atmósferas. Los tiempos de reacción son comúnmente del orden de 10 a 60 minutos.

Se usan catalizadores sólidos para incrementar ciertas velocidades de reacción, mejorar la efectividad por ciertos productos y optimizar el consumo de hidrógeno.

El hidrotratamiento e hidroprocesamiento conducen finalmente a una reducción en el peso molecular de la alimentación. En el caso de aceites que contienen triglicérido, la molécula de triglicérido es reducida a cuatro moléculas de hidrocarburos bajo condiciones de hidroprocesamiento: una molécula de propano y tres moléculas de hidrocarburo más pesadas, comúnmente en el intervalo de C_8 a C_{18}.

3. Licuefacción indirecta

Un diesel de ultrabajo contenido de azufre tradicional puede ser producido a partir de cualquier forma de biomasa mediante un proceso de dos etapas. En primer lugar, la biomasa en convertida a un gas sintético, una mezcla gaseosa

rica en hidrógeno y monóxido de carbono. Luego, el gas sintético o gas de síntesis es convertido catalíticamente a líquidos. Comúnmente, la producción de líquidos se lleva a cabo utilizando síntesis de Fischer-Tropsch (FT). Esta tecnología aplica al carbono, gas natural y petróleos pesados. Así, en todavía otra modalidad preferida del método para producir diesel renovable, el tratamiento de la composición de lípido para producir un alcano es efectuado mediante licuefacción indirecta de la composición de lípido.

C. Combustible de jet

El uso anual en los Estados Unidos de América de combustible de jet en 2006 fue de aproximadamente 80 billones de litros (21 billones de galones). El combustible de aeroplano es de color claro a paja. El combustible más común es un combustible a base de aceite sin plomo/parafina clasificado como A-1 de aeroplano, que es producido a un conjunto de especificaciones que están indexadas internacionalmente. El combustible de aeroplano es una mezcla de un gran número de hidrocarburos diferentes, posiblemente tantos como mil o más. El intervalo de sus tamaños (pesos moleculares o números de carbonos) está restringido por los requerimientos por el producto, por ejemplo punto de congelación o punto de humo. El combustible de aeroplano tipo queroseno (en los que se incluyen Jet A y Jet A-1) tiene una distribución de número de carbono de

entre aproximadamente 8 y 16 números de carbono. El combustible de aeroplano de corte amplio o tipo naphta (en los que se incluyen Jet B) tiene comúnmente una distribución de números de carbono de entre a aproximadamente 5 y 15 carbonos.

Ambos combustibles de aeroplano (Jet A y Jet B) pueden contener un número de aditivos. Aditivos útiles incluyen pero no están limitados a antioxidantes, agentes antiestáticos, inhibidores de corrosión y agentes de inhibición de formación de hielo de sistema de combustible (FSII). Los antioxidantes impiden el engomado, y usualmente son a base de fenoles alquilados, por ejemplo AO-30, AO-31 o AO-37. Los agentes antiestáticos disipan la electricidad estática e impiden la formación de chispas. Stadis 450 con ácido dinonilnaphtilsulfónico (DINNSA) como el ingrediente activo, es un ejemplo. Inhibidores de corrosión, por ejemplo DCI-4A es usado para combustibles civiles y militares y DCI-6A es usado para combustibles militares. Agentes de FSII, incluyen por ejemplo Di-EGME.

Una solución es combinar combustibles de algas con combustibles de jet existentes. La presente invención proporciona tal solución. Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima de limitación para producir combustible de jet. Así, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir combustible de jet. Aquí con dos métodos para

producir combustible de jet a partir de los lípidos producidos por los métodos de la presente invención son provistos: cracking catalítica de fluido (FCC) e hidrodesoxigenación (HDO).

1. Cracking catalítico de fluido

El cracking catalítico de fluido (FCC) es un método que es usado para producir olefinas, especialmente propileno a partir de fracciones crudas pesadas. Hay reportes en la literatura que aceites vegetales tales como aceite de canola podrían ser procesados utilizando FCC para dar una corriente de hidrocarburo útil como un combustible de gasolina.

Los lípidos producidos por el método de la presente invención pueden ser convertidos a olefinas. El proceso involucra hacer fluir los lípidos producidos a través de una FCC y localizar una corriente de productos que consiste de olefinas, que es útil como combustible de jet. Los lípidos producidos son puestos en contacto con un catalizador de cracking a condiciones de cracking para proveer una corriente de productos que comprende olefinas e hidrocarburos útiles como combustible de jet.

En una modalidad preferida, el método para producir combustible de jet comprende: a) cultivar un microorganismo que contiene lípidos utilizando métodos revelados en la presente, b) someter a lisis el microorganismo que contiene lípidos para

producir un lisado, c) aislar el lípido del lisado y d)tratar la composición del lípido, mediante lo cual se produce el combustible de jet.

En una modalidad preferida del método para producir un combustible de jet, la composición de lípido se puede hacer fluir a través de una zona de cracking catalítica de fluido, en una modalidad, puede comprender poner en contacto la composición de lípido con un catalizador de cracking a condiciones de cracking para proveer una corriente de productos que comprende C_2 - C_5 olefinas.

En ciertas modalidades de este método puede ser deseable remover cualesquier contaminantes que pueden estar presentes en la composición de lípido. Así, antes de hacer fluir la composición de lípido a través de una zona de cracking catalítica de fluido, la composición de lípido es pre-tratada. El pre-tratamiento puede involucrar poner en contacto la composición del lípido con una resina de intercambio iónico. La resina de intercambio iónico es una resina de intercambio iónico ácida, tal como Amberlyst™-15 y pude ser usada como lecho en un reactor a través del cual la composición de lípidos se hace fluir, ya sea flujo hacia arriba o flujo hacia abajo. Otros pre-tratamientos pueden influir lavados ácidos suaves al poner en contacto la composición del lípido con un ácido, tal como ácido sulfúrico, acético, nítrico o clorhídrico. El contacto se hace con una solución de ácido diluida, usualmente

a temperatura ambiente y presión atmosférica.

La composición del lípido, opcionalmente pre-tratada, se hace fluir a una zona de FCC, en donde los componentes hidrocarbonaceos son sometidos a cracking a olefinas. El cracking catalítico se lleva a cabo al poner en contacto la composición de lípido en una zona de reacción con un catalizador compuesto de material en partículas finamente divididas. La reacción es cracking catalítica, en contraposición con hidrocracking y se lleva a cabo en ausencia de hidrógeno agregado o el consumo de hidrógeno. A medida que la reacción de cracking procede, cantidades sustanciales de coked son depositadas sobre el catalizador. El catalizador es regenerado a alta temperatura al quemar el coked del catalizador en una zona de regeneración. El catalizador que contiene el coked, denominado en la presente como "catalizador con coked", es transportado continuamente de la zona de reacción a la zona de regeneración para ser regenerado y reemplazado por el catalizador regenerado esencialmente libre de coked de la zona de regeneración. La fluidización de las partículas catalíticas mediante varias corrientes gaseosas permiten el transporte de catalizador entre la zona de reacción y la zona de regeneración. Métodos para el cracking de hidrocarburos, tales como aquellos de la composición de lípido descritos en la presente, en una corriente fluidizada de catalizador, transportar el catalizador entre las zonas de

reacción y regeneración y someter a combustible de coked en el regenerador son bien conocidos para aquellos experimentados en el arte de procesos de FCC. Aplicaciones de FCC ejemplares y catalizadores útiles para el cracking de la composición del lípido para producir C_2 – C_5 olefinas son descritos en las patentes estadounidenses 6, 538, 169; 7, 288, 685, que son incorporadas en su calidad por referencia.

En una modalidad, el cracking de la composición del lípido de la presente invención es madurar en la sección de elevador o alternativamente, la sección elevada de la zona de FCC. La composición del lípido es introducida al elevador mediante una boquilla dando como resultado la vaporización rápida de la composición de lípido. Antes de ponerse en contacto con el catalizador, la composición de lípido tendrá ordinariamente una temperatura de aproximadamente 149°C (300°F) a aproximadamente 316°C (600°F). El catalizador se hace fluir desde un recipiente mezclador al elevador, en donde se pone en contacto con la composición de lípido por un tiempo de aproximadamente dos segundos o menos.

El catalizador mezclado y los vapores de la composición de lípido que reaccionaron son luego descargados de lo alto del elevador a través de una salida y separados a una corriente de vapor producto crackeada que incluye olefinas y una conexión de partículas catalíticas cubiertas con cantidades sustanciales de coked y denominadas en general como

"catalizador con coked". En un esfuerzo por minimizar el tiempo de contacto de la composición de lípido y el catalizador que puede promover la composición adicional de los productos deseados a otros productos indeseables, cualquier arreglo de separadores tales como un arreglo de brazo de remolino pueden ser usados para remover el catalizador con coked de la corriente del producto rápidamente. El separador, por ejemplo, separador del brazo de remolino, está ubicado en una porción superior de una cámara con una zona de separación situada en la porción inferior de la cámara. El catalizador separado por el arreglo de brazo de remolino cae a la zona de separación. La corriente de vapor de producto crackeado que comprende hidrocarburos crackeados que incluyen olefinas ligeras y algo de catalizador salen de la cámara vía un conducto que está en comunicación con ciclones. Los ciclones remueven las partículas de catalizador restantes de la corriente de vapor de producto para reducir las concentraciones de partículas a niveles muy bajos. Luego, la corriente de vapor producto sale de lo alto del recipiente de separación. El catalizador separado por los ciclones es devuelto al recipiente de separación y luego a la zona de separación. La zona de separación remueve los hidrocarburos absorbidos de la superficie del catalizador mediante contacto a contracorriente con vapor saturado.

La presión parcial baja de hidrocarburo opera para favorecer la producción de olefina ligera. Así, la presión del

elevador es ajustada a aproximadamente 172 a 241 KPa (25 a 35 libras fuerza/pulgada^2) con una presión parcial de hidrocarburo de aproximadamente 35 a 172 KPa (5 a 25 libras fuerza/pulgada^2), con una presión parcial preferida de aproximadamente 69 a 138 KPa (10 a 20 libras fuerza/pulgada^2). Esta presión parcial relativamente baja para hidrocarburos es obtenida al usar vapor como diluyente a la extensión que el diluyente es de 10 a 55% en peso de la composición de lípido y preferiblemente alrededor de 15% en peso de la composición del lípido. Otros diluyentes tales como gas seco pueden ser usados para llegar a presiones parciales de hidrocarburo equivalentes.

La temperatura de la corriente sometida a cracking en la salida del elevador será de aproximadamente 510°C a 621°C (950°F a 1150°F). Sin embargo, las temperaturas de salida del elevador mayores de 566°C (1050°F) hacen más gas seco y más olefinas. Mientras que las temperaturas de salida del elevador menores de 566°C (1050°F) hacen menos etileno y propileno. Así, es preferido poner en operación el proceso de FCC a una temperatura preferida de aproximadamente 566°C a aproximadamente 630°C, una presión preferida de aproximadamente 138 kPa a aproximadamente 240 kPa (20 a 35 libras-fuerza/pulg^2 absolutas). Otra condición para el proceso es que la proporción de la composición de catalizador a lípido que puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 y preferiblemente de alrededor de 10 a aproximadamente 15.

En una modalidad del método para producir un combustible de jet, la composición de lípido es introducida en la sección de elevador de un reactor de FCC. La temperatura en la sección de elevador será muy caliente y fluctuará de aproximadamente 700°C (1292°F) a aproximadamente 760°C (1400°F) con una proporción de catalizador a composición de lípido de aproximadamente 100 a aproximadamente 150. Se anticipa que al introducir la composición del lípido a la sección de elevador producirá cantidades considerables de propileno y etileno.

Los productos de gas e hidrocarburo líquidos producidos pueden ser analizados mediante cromatografía de gases, HPLC, etc.

2. Hidrodesoxigenación

En otra modalidad del método para producir un combustible de jet utilizando la composición de lípido o los lípidos producidos como se describe en la presente, la estructura de la composición de lípido o los lípidos es descompuesta mediante un proceso denominado como hidrodesoxigenación (HDO).

HDO significa la remoción de oxígeno por medio de hidrógeno, esto es, el oxígeno es removido en tanto que se rompe la estructura del material. Los dobles enlaces olefínicos son hidrogenados y cualesquier compuestos de azufre y nitrógeno son removidos. La remoción de azufre es llamada

hidrodesulfurización (HDS). El pre-tratamiento y pureza de las materias primas (composición de lípido o los lípidos) contribuyen a la vi de servicio del catalizador.

En general en la etapa de HDO/HDS, el hidrógeno es mezclado con la materia prima de alimentación (composición de lípido o los lípidos) y luego la mezcla se hace pasar a través de un lecho catalítico como un flujo a co-corriente, ya sea como una sola fase o como una materia prima de alimentación de dos fases. Después de la etapa de HDO/MDS, la fracción de producto es separada y se hace pasar a un reactor de isomerización separado. Un reactor de isomerización para el material de partida biológico es descrito en la literatura (FI 100 248) como un reactor a co-corriente.

El proceso para producir un combustible mediante hidrogenación de una alimentación de hidrocarburo, por ejemplo, la composición de lípido o los lípidos en la presente, puede también ser efectuado al hacer pasar la composición de lípido o los lípidos como un flujo a co-corriente con gas hidrógeno a través de una primera zona de hidrogenación y después de esto, el afluente de hidrocarburo es hidrogenado adicionalmente en una segunda zona de hidrogenación al hacer pasar el gas hidrógeno a la segunda zona de hidrogenación como un flujo a contra-corriente en relación con el efluente de hidrocarburo. Aplicaciones de HDO ejemplares y catalizadores útiles para el cracking de la composición de lípido para producir C_2-C_5

olefinas son descritos en la patente estadounidense No. 7,232,935, que es incorporada en su totalidad por referencia.

Comúnmente, en la etapa de hidrodesoxigenación, la estructura del componente biológico, tal como la composición de lípido o lípidos en la presente, es descompuesta, el oxígeno, nitrógeno, fósforo y compuestos de azufre e hidrocarburos ligeros como gas son removidos y los enlaces olefínicos son hidrogenados. En la segunda etapa del proceso, esto es, en la llamada etapa de isomerización, la isomerización se lleva a cabo para la ramificación de la cadena de hidrocarburos y para mejorar el desempeño de la parafina a bajas temperaturas.

En la primera etapa, esto es, la etapa de HDO del proceso de cracking, el gas de hidrógeno y la composición de lípido o lípidos en la presente que van a ser hidrogenados se hacen pasar a un sistema de lecho catalítico de HDO ya sea como flujos a co-corriente o a contra-corriente, el sistema de lecho catalítico comprende uno o más lechos catalítico, preferiblemente 1-3 lechos catalíticos. La etapa de HDO se pone en operación comúnmente en una manera a co-corriente. En el caso de un sistema de lecho catalítico de HDO que comprende dos o más lechos catalíticos, uno o más de los lechos se pueden poner en operación utilizando el principio de flujo a contra-corriente.

En la etapa de HDO, la presión varía entre 20 y 150 bars, preferiblemente entre 50 y 100 bars y la temperatura

varía entre 200 y 500°C, preferiblemente en el intervalo de 300-400°C.

En la etapa de HDO, catalizadores de hidrogenación conocidos que contienen metales del Grupo VII y/o VIB del sistema periódico pueden ser usados. Preferiblemente, los catalizadores de hidrogenación son catalizadores de Pd, Pt, Ni, NiMo o CoMo soportados, el soporte consiste de alúmina y/o sílice. Comúnmente, se usan catalizadores de $NiMo/Al_2O_3$ y $CoMo/Al_2O_3$.

Antes de la etapa de HDO, la composición de lípido o lípidos en la presente pueden opcionalmente ser tratados mediante pre-hidrogenación bajo condiciones más suaves, evitando así reacciones secundarias de los dobles enlaces. Tal pre-hidrogenación se lleva a cabo en presencia de un catalizador de pre-hidrogenación a temperaturas de 50-400°C y a presiones de hidrógeno de 1-200 bars, preferiblemente a una temperatura de entre 150 y 250°C y una presión de hidrógeno de entre 10 y 100 bars. El catalizador puede contener metales del Grupo VIII y/o VIB del sistema periódico. Preferiblemente, el catalizador de pre-hidrogenación es un catalizador de Pd, Pt, Ni, NiMo y CoMo soportado, el soporte consiste de alúmina y/o sílice.

Una corriente gaseosa de la etapa de HDO que contiene hidrógeno es enfriada y luego el monóxido de carbono, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y compuestos de azufre,

hidrocarburos ligeros gaseosos y otras impurezas son removidos en la misma. Después de la compresión, el hidrógeno purificado o hidrógeno reciclado es devuelto al primer lecho catalítico y/o entre los lechos catalíticos para compensar la extracción de la corriente de gas. El agua es removida del líquido condensado. El líquido se hace pasar al primer lecho catalítico o entre los lechos catalíticos.

Después de la etapa de HDO, el producto es sometido a una etapa de isomerización. Es sustancial para el proceso que las impurezas sean removidas tan completamente como sea posible antes de que los hidrocarburos se pongan en contacto con el catalizador de isomerización. La etapa de isomerización comprende una etapa de separación opcional, en donde el producto de reacción de la etapa HDO puede ser purificado mediante separación o destilación con vapor de agua o un gas apropiado tal como hidrocarburo ligero, nitrógeno o hidrógeno. La etapa de destilación o separación opcional se lleva a cabo a manera a contra-corriente en una unidad corriente arriba del catalizador de isomerización, en donde el gas y líquido se ponen en contacto entre sí o antes del reactor de isomerización real en una unidad de separación separada que utiliza el principio a contra-corriente.

Después de la etapa de separación en gas hidrógeno y la composición de lípido hidrogenada o lípidos en la presente y opcionalmente una mezcla de n-parafina, se hacen pasar a una

unidad de isomerización reactiva que comprende uno o varios lechos catalíticos. Los lechos catalíticos de la etapa de isomerización pueden operar ya sea en una manera a co-corriente o a contra-corriente.

Es importante para el proceso que el principio de flujo a contra-corriente sea aplicado en la etapa de isomerización. En la etapa de isomerización. Esto se hace al llevar a cabo ya sea la etapa de separación opcional o la etapa de reacción de isomerización o ambas a manera a contra-corriente.

La etapa de isomerización y la etapa de HDO se pueden llevar a cabo en el mismo recipiente a presión o en recipientes a presión separados. La pre-hidrogenación opcional se puede llevar a cabo en un recipiente a presión separado o en el mismo recipiente a presión como las etapas de HDO e isomerización.

En la etapa de isomerización, la presión varía en el intervalo de 20-150 bars, preferiblemente en el intervalo de 20-100 bars, la temperatura es de entre 200 y 500°C, preferiblemente entre 300 y 400°C.

En la etapa de isomerización, se puede usar catalizadores de isomerización conocidos en el arte. Catalizadores de isomerización apropiados contienen tamices moleculares y/o un metal del Grupo VII y/o un portador. Preferiblemente, el catalizador de isomerización contiene SAPO-11 o SAPO41 o ZSM-22 o ZSM-23 o ferrierita y Pt, Pd o Ni y

Al_2O_3 i SiO_2. Catalizadores de isomerización típicos son por ejemplo Pt/SAPO-11/Al_2O_3, Pt/ZSM-22/Al_2O_3, Pt/ZSM-23/Al_2O_3 y Pt/SAPO-11l/SiO_2.

En cuanto al producto, un componente de hidrocarburo de alta calidad de origen biológico, útil como un combustible de diesel o un componente del mismo, es obtenido, la densidad, número de cetano y desempeño a baja temperatura de dicho componente de hidrógeno son excelentes.

IX. DISEÑO DE MICROBIO

Como se indica anteriormente, en ciertas modalidades de la presente invención, es deseable modificar genéticamente un microorganismo para mejorar la producción de lípido, modificar las propiedades o proporciones de componentes generados por el microorganismo o mejorar o proveer las características de crecimiento de novo sobre una variedad de materias primas de alimentación. *Chlorella*, particularmente *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.* y *Chlorella emersonii* son microorganismos preferidos para uso en los métodos de diseño genéticos descritos en la presente, aunque otras especies de *Chlorella* también como otras variedades de microorganismos pueden ser usados.

Promotores, cADN y 3'UTR, también como otros elementos de los vectores, pueden ser generados por medio de técnicas de clonación utilizando fragmentos aislados de fuentes

naturales (véase por ejemplo *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al. (3d edición, 2001, Cold Spring Harbor Press; y patente estadounidense 4,683,202). Alternativamente, se pueden generar elementos sintéticamente utilizando métodos conocidos (véase por ejemplo Gene. 1995 Oct 16; 164(l):49-53).

A. Optimización de Codón para la Expresión

ADN que codifica un polipéptido a ser expresado en un microorganismo, por ejemplo, una lipasa y marcador seleccionable son preferiblemente cADN codón-optimizados. Métodos para recodificar genes para expresión en microalgas son descritos en la patente estadounidense 7,135,290. Información adicional para la optimización de codón está disponible, por ejemplo, en la base de datos de uso de codón de GenBank. Como ejemplos no limitantes, el uso de codón en *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella* salina y *Chlorella protothecoides* son mostrados en las Tablas 10, 11 y 12, respectivamente.

Tabla 10. Uso de codón *Chlorella pyrenoidosa*.

Phe	UUU	39 (0.82)	Ser	UCU	50 (1.04)
	UUC	56 (1.18)		UCC	60 (1.25)
Leu	UUA	10 (0.20)		UCA	6 (0.96)
	UUG	46 (0.91)		UCG	43 (0.89)
Tyr	UAU	15 (0.59)	Cys	UGU	46 (0.77)
	UAC	36 (1.41)		UGC	73 (1.23)
ter	UAA	9 (0.00)	ter	UGA	43 (0.00)
ter	UAG	15 (0.00)	Trp	UGG	69 (1.00)
Leu	CUU	49 (0.97)	Pro	CCU	80 (0.98)
CUC		73 (1.45)	CCC		88 (1.08)
	CUA	22 (0.44)		CCA	93 (1.14)
	CUG	103 (2.04)		CCG	65 (0.80)
His	CAU	50 (0.88)	Arg	CGU	39 (0.76)
	CAC	3 (1.12)		CGC	63 (1.23)
Gln	CAA	59 (0.84)		CGA	46 (0.90)
	CAG	2 (1.16)		CGG	47 (0.92)
Ile	AUU	24 (0.69)	Thr	ACU	32 (0.67)
	ABC	61 (1.76)		ACC	76 (1.60)
	AUA	19 (0.55)		ACA	41 (0.86)
Met	AUG	42 (1.00)		ACG	41 (0.86)
Asn	AAU	26 (0.75)	Ser	AGU	23 (0.48)
	AAC	3 (1.25)		AGC	67 (1.39)
Lys	AAA	32 (0.54)	Arg	AGA	51 (1.00)
	AAG	86 (1.46)		AGG	61 (1.19)

Val	GUU	36 (0.75)		Ala	GCU	57 (0.79)	
	GUC	54 (1.13)			GCC	97 (1.34)	
	GUA	30 (0.63)			GCA	89 (1.23)	
	GUG	71 (1.49)			GCG	47 (0.65)	
Asp	GAU	60 (0.95)		Gly	GGU	35 (0.60)	
	GAC	66 (1.05)			GGC	78 (1.33)	
Glu	GAA	41 (0.68)			GGA	54 (0.92)	
	GAG	80 (1.32)			GGG	67 (1.15)	

Tabla 11. Uso de codón preferido en *Dunaliella salina*.

TTC (Phe)	TAC (Tyr)	TGC (Cys)	TAA (Stop)
TGG (Trp)	CCC (Pro)	CAC (His)	CGC (Arg)
CTG (Leu)	CAG (Gln)	ATC (Ile)	ACC (Thr)
AAC (Asn)	AGC (Ser)	ATG (Met)	AAG (Lys)
GCC (Ala)	GAC (Asp)	GGC (Gly)	GTG (Val)
GAG (Glu)			

Tabla 12. Uso de codón preferido en *Chlorella protothecoides*.

TTC (Phe)	TAC (Tyr)	TGC (Cys)	TGA (Stop)
TGG (Trp)	CCC (Pro)	CAC (His)	CGC (Arg)
CTG (Leu)	CAG (Gln)	ATC (Ile)	ACC (Thr)
GAC (Asp)	TCC (Ser)	ATG (Met)	AAG (Lys)
GCC (Ala)	AAC (Asn)	GGC (Gly)	GTG (Val)

GAG (Glu)

B. Promotores

Muchos promotores son activos en microalgas, en los que se incluyen promotores que son endógenos a las algas que son transformadas, también como promotores que no son endógenos a las algas que son transformadas (esto es, promotores de otras algas, promotores de plantas superiores y promotores de virus de plantas o virus de algas). Promotores exógenos y/o endógenos que son activos en microalgas y genes de resistencia a antibiótico funcionales en microalgas son descritos por ejemplo, Curr Microbiol. 1997 Dic; 35(6):356-62 (*Chlorella vulgaris*); Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene; 4(l):63-73 (*Chlorella ellipsoidea*); Mol Gen Genet. 1996 Oct 16; 252(5):572-9 (Phaeodactylum tricornutum); Plant Mol Biol. 1996 Abr; 31(1):1-12 (Volvox carteri); Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 22;91 (24): 11562-6 (Volvox carteri); Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C, PMID: 10383998, 1999 May; l(3):239-251 (Laboratory of Molecular Plant Biology, Stazione Zoologica, Villa Comunale, 1-80121 Napoles, Italia) (Phaeodactylum tricornutum y Thalassiosira weissflogii); Plant Physiol. 2002 May; 129(l):7-12. (Porphyridium sp.); Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Ene 21;100(2):438-42. (Chlamydomonas reinhardtii); Proc Natl Acad Sci USA. 1990 Feb; 87(3): 1228-32. (Chlamydomonas reinhardtii); Nucleic Acids Res. 1992 Ene

25;20(12):2959-65; Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene; 4(l):63-73 (*Chlorella*); Biochem Mol Biol Int. 1995 Ago; 36(5): 1025-35 (Chlamydomonas reinhardtii); J Microbiol. 2005 Ago; 43(4):361-5 (Dunaliella); Yi Chuan Xue Bao. 2005 Abr; 32(4):424-33 (Dunaliella); Mar Biotechnol (NY). 1999 May; 1(3):239-251. (Thalassiosira y Phaedactylum); Koksharova, *Appl Microbiol Biotechnol* 2002 Feb; 58(2): 123-37 (varias especies); Mol Genet Genomics. 2004 Feb; 271(l):50-9 (Thermosynechococcus elongates); J. Bacterid. (2000), 182, 211-215; FEMS Microbiol Lett. 2003 Abr 25; 221(2):155-9; Planta Physiol. 1994 Jun; 105(2):635-41; Plant Mol Biol. 1995 Dic; 29(5):897-907 (Synechococcus PCC 7942); Mar Pollut Bull. 2002; 45(1-12):163-7 (Anabaena PCC 7120); Proc Natl Acad Sci USA. 1984 Mar; 81(5):1561-5 (Anabaena (varias cepas)); Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Mar 27; 98(7):4243-8 (Synechocystis); Wirth, Mol Gen Genet 1989 Mar; 216(l):175-7 (varias especies); Mol Microbiol, 2002 Jun; 44(6): 1517-31 y Plasmid, 1993 Sep; 30(2):90-105 (Fremyella diplosiphon); Hall et al. (1993) Gene 124: 75-81 (Chlamydomonas reinhardtii); Gruber et al. (1991). Current Micro. 22: 15-20; Jarvis et al. (1991) Current Genet. 19: 317-322 (Chlorella); para promotores adicionales véase también Tabla 1 de la patente estadounidense 6,027,900).

El promotor usado para expresar un gen exógeno puede ser el promotor enlazado naturalmente a aquel gen o puede ser un gen heterólogo. Algunos promotores son activos en más de una

especie de microalgas. Otros promotores son específicos de la especie. Promotores preferidos incluyen promotores tales como RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtiik* y promotores virales, tales como virus de mosaico de coliflor (CMV) y virus de *Chlorella*, que han mostrado ser activos en múltiples especies de microalgas (véase por ejemplo Plant Cell Rep. 2005 Mar; 23(10-11):727-35; J Microbiol. 2005 Ago; 43(4):361-5; Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene; 4(1):63-73). En otras modalidades, el promotor de malato deshidrogenasa *Botryococcus*, tal como un ácido nucleico que comprende cualquier parte de SEQ ID NO: 3 o el promotor RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtiik* (SEQ ID NO: 4) pueden ser usados. Opcionalmente, por lo menos 10, 20, 30, 40, 50 o 60 nucleótidos o más de estas secuencias que contienen un promotor son usados. Promotores preferidos endógenos a especies del género *Chlorella* son SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Promotores preferidos útiles para expresión de genes exógenos en *Chlorella* son enlistadas en el listado de secuencias de esta solicitud, tal como el promotor del gen HUP1 de *Chlorella* (SEQ ID NO: 1) y el promotor de nitrato reductasa de *Chlorella ellipsoidea* (SEQ ID NO: 2). Promotores de virus de *Chlorella* pueden también ser usados para expresar genes en *Chlorella*, tales como SEQ ID NO: 1-7 de la patente estadounidense 6,395,965. Promotores adicionales activos en *Chlorella* pueden ser encontrados, por ejemplo en Biochem Biophys Res Commun. 1994 Oct 14; 204(l): 187-94; Plant Mol

Biol. 1994 Oct; 26(l):85-93; Virology. 2004 Ago 15; 326(l):150-9; y Virology. 2004 Ene 5; 318(l):214-23.

C. Marcadores Seleccionables

Cualquiera de una amplia variedad de marcadores seleccionables pueden ser empleados en un constructo de transgen útil para transformar *Chlorella*. Ejemplos de marcadores seleccionables apropiados incluyen el gen de nitrato reductasa, el gen de higromicina fosfotransferasa (HPT), el gen de neomicina fosfotransferasa y el gen ble, que confiere resistencia a fleomicina. Métodos para determinar la sensibilidad de microalgas a antibióticos son bien conocidos. Por ejemplo, Mol Gen Genet. 1996 Oct 16; 252(5):572-9.

Más específicamente, Dawson et al. (1997), Current Microbiology 35:356-362 (incorporada por referencia en la presente en su totalidad), describen el uso del gen de nitrato reductasa (NR) de *Chlorella vulgaris* como marcador seleccionable para mutantes de *Chlorella sorokiniana* NR-deficientes. Kim et al. (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73 (incorporada por referencia en la presente en su totalidad), revelaron el uso del gen de HPT como marcador seleccionable para transformar *Chorella ellipsoidea*. Huang et al. (2007), Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 197-205 (incorporada por referencia en la presente en su totalidad), reportaron el uso de ble de Sh como marcador seleccionable para *Chlorella sp*. DT.

D. <u>Expresión Inducible</u>

La presente invención también proporciona el uso de un promotor inducible para expresar un gen de interés. En particular, el uso de un promotor inducible para expresar un gen de lipasa permite la producción de lipasa después del crecimiento del microorganismo cuando las condiciones han sido ajustadas, si es necesario, para mejorar la transesterificación, por ejemplo, después de la disrupción de las células, reducción del contenido de agua de la mezcla de reacción, y/o adición de alcohol suficiente para impulsar la conversión de TAG a ésteres de ácido graso.

Promotores inducibles útiles en la invención incluyen aquellos que moderan la transcripción de un gen enlazado operativamente en respuesta a un estímulo, tal como una molécula pequeña provista exógenamente (por ejemplo, glucosa, como en SEQ ID NO: 1), temperatura (calor o frío), luz, etc. Promotores apropiados pueden activar la transcripción de un gen esencialmente silente o regular hacia arriba, de preferencia sustancialmente, la transcripción de un gen enlazado operativamente que es transcrito a un bajo nivel. En el último caso, el nivel de transcripción de la lipasa preferiblemente no interfiere significativamente con el crecimiento del microorganismo en el cual es expresado.

La expresión de transgenes en *Chlorella* puede ser

efectuada indeciblemente por medio de promotores tales como el promotor que impulsa el gen transportador de hexosa de *Chlorella* (SEQ ID NO: 1). Este promotor es fuertemente activado por la presencia de glucosa en el medio de cultivo.

E. Expresión de dos o más genes exógenos

Además, un microorganismo diseñado genéticamente, tal como una microalga, puede comprender y expresar dos o más genes exógenos, tales como por ejemplo, una lipasa y un gen litico, por ejemplo uno que codifica una enzima polisacárido-degradante. Uno o ambos genes pueden ser expresados utilizando un promotor inducible, lo que permite la temporización relativa de expresión de expresión de estos genes sea controlada para mejorar el rendimiento de lípido y conversión a ésteres de ácido graso. La expresión de los dos o más genes exógenos puede estar bajo el control del mismo promotor inducible o bajo el control de promotores inducibles diferentes. En la última situación, la expresión de un primer gen exógeno puede ser inducida por un primer período de tiempo (durante el cual la expresión de un segundo gen exógeno puede o puede no ser inducida) y la expresión de un segundo gen exógeno puede ser inducida por un segundo período de tiempo (durante el cual la expresión de un primer gen exógeno puede o puede no ser inducida). Se proporcionan en la presente vectores y métodos para diseñar microbios que producen lípidos para metabolizar

sacarosa, que es un rasgo ventajoso debido a que permite que las células diseñadas conviertan materia prima de alimentación de caña de azúcar a lípidos.

También se proporcionan en la presente cepas diseñadas genéticamente de microbios (por ejemplo, microalgas, levadura oleaginosa, bacterias u hongos) que expresan dos o más genes exógenos, tales como por ejemplo, una acil-ACP tioesterasa grasa y una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, la acción combinada de las cuales produce un producto de alcohol. Se proporciona además otras combinaciones de genes exógenos, en los que se incluyen sin limitación, una acil-ACP tioesterasa grasa y una acil-CoA reductasa grasa para generar aldehídos. Además, la presente solicitud proporciona la combinación de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa y un aldehído decarboxilasa grasa para generar alcanos. Uno o más de los genes exógenos pueden ser expresados utilizando un promotor inducible.

Ejemplos de modificaciones además apropiadas para uso en la presente invención incluyen cepas diseñadas genéticamente de microalgas para expresar dos o más genes exógenos, uno que codifica un transportador de una fuente de carbono fija (tal como sacarosa) y un segundo que codifica una enzima de invertasa sacarosa. Los organismos fermentables resultantes producen hidrocarburos a un costo de manufactura más bajo que aquel que ha sido obtenible mediante métodos previamente

conocidos de producción de hidrocarburos biológicos. La inserción de los dos genes exógenos descrita en la presente puede ser combinada con la disrupción de biosíntesis de polisacáridos por medio de mutagénesis directa y/o aleatoria, que dirige el flujo de carbono aun mayor a la producción de hidrógeno. Individualmente y en combinación, la conversión trófica, diseño para alterar la producción de hidrocarburo y tratamiento con enzimas exógenas alteran la composición de hidrocarburo producida por un microorganismo. La alteración puede ser un cambio en la cantidad de hidrógenos producidos, la cantidad de una o más especies de hidrocarburos producidas en relación con otros hidrocarburos y/o los tipos de especies de hidrocarburo producidos en el microorganismo. Por ejemplo, las microalgas pueden ser diseñadas para producir una cantidad más alta y/o porcentaje más alto de TAG.

F. <u>Expresión por Compartimientos</u>

La presente invención también proporciona la expresión por compartimientos de un gen de interés. En particular, puede ser ventajoso en modalidades particulares, apuntar la expresión de la lipasa a uno o más compartimientos celulares, en donde es secuestrada de la mayoría de lípidos celulares hasta el inicio de la reacción de transesterificación. Organelos preferidos para apuntamiento son cloroplastos, mitocondria y retículo endoplásmico.

1. Expresión en Cloroplastos

En una modalidad de la presente invención, la expresión de un polipéptido en un microorganismo es apuntada a cloroplastos. Métodos para el apuntamiento de la expresión de un gen heterólogo al cloroplasto son conocidos y pueden ser empleados en la presente invención. Métodos para apuntamiento de productos genéticos extraños a cloroplastos son descritos en Shrier et al., EMBO J. (1985) 4:25 32. Véase también Tomai et al. Gen. Biol. Chem. (1988) 263:15104 15109 y patente estadounidense No. 4,940,835 para el uso de péptidos de tránsito para translocar productos genéticos nucleares al cloroplasto. Métodos para dirigir el transporte de proteínas al cloroplasto son también revisados en Kenauf TIBTECH (1987) 5:40 47. Secuencias de apuntamiento de cloroplasto endógenas a *Chlorella* son conocidas, tales como genes en el genoma nuclear de *Chlorella* que codifican proteínas que son apuntadas al cloroplasto; véase por ejemplo número de acceso GenBank AY646197 y AF499684.

Wageningen UR - Plant Research International vende un vector IMPACTVECTOR1.4, que usa la señal de secreción de la proteína de subunidad pequeña de Chrysanthemum morifolium para administrar una proteína heteróloga al medio ambiente de estroma de cloroplasto (citoplásmico), lanzándose a través de un sistema de doble membrana. La proteína es fusionada a los

primeros 11 aminoácidos de las proteína de rubisco madura con el fin de permitir el procesamiento apropiado del péptido de señal (Wong et al., Plant Molecular Biology 20: 81-93 (1992)). El péptido de señal contiene un intrón natural del ge RbcS.

En otro procedimiento, el genoma de cloroplasto es diseñado genéticamente para expresar la proteína heteróloga. Se ha descrito la transformación estable de cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtiik* (una alga verde) utilizando bombardeo de células receptoras con micro-proyectiles de tungsteno de alta velocidad recubiertos con ADN extraño. Véase, por ejemplo, Boynton et al., Science (1988) 240: 1534 1538; Blowers et al. Plant Cell (1989) 1:123 132 y Debuchy et al., EMBO J. (1989) 8: 2803 2809. La técnica de transformación utilizando micro-proyectiles de tungsteno es descrita por Klein et al., Nature (Londres) (1987) 7:70 73. Otros métodos de transformación de cloroplasto tanto para plantas como microalgas son conocidos. Véanse, por ejemplo patentes estadounidenses 5,693,507; 6,680,426; y Plant Physiol. 2002 mayo; 129(l):7-12; y Plant Biotechnol J. 2007 mayo; 5(3):402-12.

Como se describe en patente estadounidense No. 6,320,101 (expedida el 20 de noviembre de 2001 a Kaplan et al.; que es incorporado en la presente por referencia), las células pueden ser tratadas químicamente para reducir el número de cloroplastos por célula a aproximadamente uno. Luego, el ácido

nucleico heterólogo puede ser introducido a las células vía bombardeo de partículas el objetivo de introducir por lo menos una molécula de ácido nucleico heteróloga a los cloroplastos. El ácido nucleico heterólogo es seleccionado de tal manera que es integrable al genoma del cloroplasto vía recombinación homóloga que es fácilmente efectuada por enzimas inherentes al cloroplasto. Para este fin, el ácido nucleico heterólogo incluye, además de un gen de interés, por lo menos una secuencia de ácido nucleico que es derivada del genoma del cloroplasto. Además, el ácido nucleico heterólogo incluye un marcador seleccionable. Detalles adicionales con respecto a esta técnica se encuentra en las patentes estadounidenses. Nos. 4,945,050 y 5,693,507 que son incorporadas en la presente por referencia. Un polipéptido puede así ser producido por el sistema de expresión de proteína del cloroplasto.

La patente estadounidense No. 7,135,620 (expedida el 14 de noviembre de 2006 a Daniell et al.; incorporada en la presente por referencia) describe vectores de expresión de cloroplasto y métodos relacionados. Los casets de expresión son constructos de ADN que incluyen una secuencia de codificación y secuencias de control apropiadas para proporcionar la expresión apropiada de la secuencia de codificación en el cloroplasto. Casets de expresión típicos incluyen los siguientes componentes: la región 5’ sin traducir de un gen de microorganismo o gen de cloroplasto tal como psbA que

proporcionará la transcripción y traducción de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés en el cloroplasto; una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés; y una región de terminación de traducción y transcripción, tal como una región de repetición 3' invertida de un gen de cloroplasto que puede estabilizar ARN de genes introducidos, mejorando mediante esto la expresión del gen extraño. El caset puede incluir opcionalmente un gen de resistencia a antibiótico.

Comúnmente, el caset de expresión es flanqueado por sitios de restricción convenientes para inserción a un genoma apropiado. El caset de expresión puede ser flanqueado por secuencias de ADN del ADN de cloroplasto para facilitar la integración estable del caset de expresión al genoma de cloroplasto, particularmente mediante recombinación homóloga. Alternativamente, el caset de expresión puede permanecer sin integrar, en cuyo caso, el caset de expresión incluye comúnmente un origen de replicación de cloroplasto, que es capaz de proveer la replicación del ADN heterólogo en el cloroplasto.

El caset de expresión incluye en general una región de promotor de un gen capaz de expresión en el cloroplasto. La región de promotor puede incluir promotores obtenibles de genes de cloroplasto, tal como el gen de psbA de espinaca o garbanzo o la región de promotor de rbcL y atpB de maíz y promotores de

Rrna. Ejemplos de promotores son descritos en Hanley-Bowdoin y Chua, TIBS (1987) 12:67 70; Mullet et al., Plant Molec Biol. (1985) 4: 39 54; Hanley-Bowdoin (1986) PhD. Dissertation, the Rockefeller University; Krebbers et al., Nucleic Acids Res. (1982) 10: 4985 5002; Zurawaki et al., Nucleic Acids Res. (1981) 9:3251 3270; y Zurawski et al., Proc. Nat'l Acad Sci. U.S.A. (1982) 79: 7699 7703. Otros promotores pueden ser identificados y la fuerza relativa de promotores así identificados evaluada, al colocar un promotor de interés 5' a un gen marcador sin promotor y observar su efectividad en relación con la transcripción obtenida de por ejemplo el promotor del gen psbA, un promotor de cloroplasto relativamente fuerte. La eficiencia de la expresión del gen heterólogo puede ser mejorada adicionalmente mediante cualquiera de una variedad de técnicas. Estas incluyen el uso de múltiples promotores insertados en tándem 5’ al gen heterólogo, por ejemplo un promotor psbA doble, la adición de secuencias de mejorador y los semejantes.

Numerosos promotores activos en el cloroplasto de *Chlorella* pueden ser usados para expresión de genes exógenos en el cloroplasto de *Chlorella*, tales como aquellos encontrados en el número de acceso de Genbank NC_001865 (cloroplasto de *Chlorella vulgaris*, genoma completo).

En donde se desea proveer la expresión inducible del gen heterólogo, un promotor inducible y/o una región 5’ sin

traducir que contiene secuencias que proporcionan la regulación a nivel de transcripción y/o traducción (en el extremo 3') puede ser incluidas en el caset de expresión. Por ejemplo, la región sin traducir 5' puede ser de un gen en donde la expresión es regulable por la luz. Similarmente, las regiones de repetición 3' invertidas podrían ser usadas para estabilizar ARN de genes heterólogos. Los genes inducibles pueden ser identificados mediante expresión mejorada en respuesta a un estímulo de interés particular y baja expresión o expresión ausente en ausencia del estímulo. Por ejemplo, un gen inducible por luz puede ser identificado, en donde la expresión mejorada ocurre durante la irradiación con luz, en tanto que una expresión sustancialmente reducida o ninguna expresión ocurre con baja luz o ninguna luz. Promotores regulador por luz de microalgas verdes son conocidos (véase por ejemplo Mol Genet Genomics. 2005 Dic; 274(6):625-36).

La región de terminación que es empleada será principalmente una de conveniencia, puesto que la región de terminación parece ser relativamente intercambiable entre proplastos y bacterias. La región de terminación puede ser natural a la región de inicio de transcripción, puede ser natural a la secuencia de ADN de interés o puede ser obtenible de otra fuente. Véase, por ejemplo, Chen and Orozco, Nucleic Acids Res. (1988) 16:8411.

Los cassettes de expression pueden ser transformados

a una célula de planta de interés mediante cualquiera de una diversidad de métodos. Estos métodos incluyen, por ejemplo métodos biolísticos (véase, por ejemplo Sanford, Trends In Biotech. (1988) 6:299 302, Patente Estadounidense 4,945,050; electroporación (Fromm et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1985) 82:5824 5828); el uso de un as de láser, microinyección o cualquier otro método capaz de introducir ADN a un cloroplasto.

Descripciones adicionales de vectores de expresión de cloroplasto apropiados para uso en microorganismos tales como microalgas se encuentran en la Patente Estadounidense 7,081,567 (expedida el 25 de Julio de 2006 a Xue et al.); 6,680,426 (expedida el 20 de Enero de 2004 a Daniell et al.); y 5,693,507 (expedida el 2 de diciembre de 1997 a Daniell et al.).

Proteínas expresadas en el genoma nuclear de Chlorella pueden ser apuntadas al cloroplasto utilizando señales de apuntamiento de cloroplasto. Secuencias de apuntamiento de cloroplasto endógenas a Chlorella son conocidas, tales como genes en el genoma nuclear de Chlorella que codifican proteínas que son apuntadas al cloroplasto; véase, por ejemplo números de acceso GenBank AY646197 y AF499684. Las proteínas pueden también ser expresadas en el cloroplasto de Chlorella mediante inserción de genes directamente al genoma de cloroplasto. La transformación de cloroplasto ocurre comúnmente por medio de recombinación

homóloga y puede ser efectuada si las secuencias de genoma de cloroplasto son conocidas para creación de vectores de apuntamiento (véase, por ejemplo la secuencia de genoma completa de un cloroplasto de Chlorella; número de acceso Genbank NC_001865). Véase seccones previas en la presente para detalles de transformación de cloroplasto.

2. Expresión en mitocondrias

En otra modalidad de la presente invención, la expresión de un polipéptido en un microorganismo es apuntada a mitocondrias. Métodos para apuntamiento de productos de gen extraño a mitocondrias Boutry et al. Nature (London) (1987) 328:340 342) han sido descritos, en los que se incluyen en microalgas verdes (véase, por ejemplo MoI Gen Genet. 1993 Jan;236(2-3):235-44).

Por ejemplo, un vector de expresión que codifica una señal de secreción apropiada puede apuntar una proteína heteróloga a la mitocondria. El vector IMP ACTVECTOR 1.5 vector, de Wageningen UR- Plant Research International, utiliza la señal de secreción de CoxIV de levadura, que demostró administrar proteínas en la matriz mitocondrial. La proteína es fusionada a los primeros cuatro aminoácidos de la proteína CoxIV de levadura con el fin de permitir el procesamiento apropiado del péptido de señal (Kohler et al. Plant J I l : 613-621 (1997)). Otras secuencias de apuntamiento

mitocondriales son conocidas, en las que se incluyen aquéllas funcionales en microalgas verdes. Por ejemplo, véase FEBS Lett. 1990 Jan 29;260(2): 165-8; y J Biol Chem. 2002 Feb 22;277(8):6051-8.

Las proteínas expresadas en el genoma nuclear de Chlorella pueden ser apuntadas a la mitocondria utilizando señales de apuntamiento mitocondriales. Véase secciones previas en la presente para detalles de apuntamiento de proteína mitocondrial y transformación.

3. Expresión en Retículo Endoplásmico

En otra modalidad de la presente invención, la expresión de un polipéptido en un microorganismo es apuntada al retículo endoplásmico. La inclusión de una señal de retención o clasificación apropiada en un vector de expresión asegura que las proteínas sean requeridas en el retículo endoplásmico (ER) y no avancen corriente abajo al aparato Golgi. Por ejemplo, el vector IMPACTVECTOR1.3, de Wageningen UR- Plant Research International, incluye la señal de retención o clasificación KDEL bien conocida. Con este vector, la retención de ER tiene una ventaja práctica en que se ha reportado que mejora los niveles de expresión 5 veces o más. La razón principal por esto parece ser que el ER contiene concentraciones más bajas y/o diferentes proteasas responsables por la degradación post-producción de proteínas expresadas que están presentes en el

citoplasma. Señales de retención de ER funcionales en microalgas verdes son conocidas. Por ejemplo, véase Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):6225-30.

G. Transformación

Las células pueden ser transformadas mediante cualquier técnica apropiada en las que se incluyen por ejemplo, biolísticas, electroporación, transformación en lecho de vidrio y transformación en bigote de carburo de silicio. Véase, por ejemplo, Ejemplos en la presente.

Cualquier técnica conveniente para introducir un transgen a Chlorella puede ser usada en la presente invención. Dawson et al. (1997) (supra) describió el uso de bombardeo de micro-proyectiles para introducir el gen de nitrato reductasa (NR) de Chlorella vulgaris a mutantes de Chlorella sorokiniana NR-deficientes, dando como resultado transformantes estables. Brevemente, perlas de tungsteno de 0.4 micras fueron recubiertas con plásmido; 3 X 10^7 células de c.sorokiniana fueron esparcidas en el tercio central de una placa de agar no selectiva y bombardeadas con el sistema de distribución de partículas biolísticas PDS- 1000/He Biolistic Particle Delivery© (Bio-Rad).

Un método preferido para introducir un gen a Chlorella es el método descrito por Kim et al. (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73. Kim reporta la transformación de

protoplastos de Chorella ellipsoidea utilizando $CaCl_2$ y polietilenglicol (PEG). En particular, los protoplastos fueron preparados al cultivar células de C.ellipsoidea a una densidad de 1-2 X 10^8/M1. Las células fueron recuperadas y lavadas mediante centrifugación por 5 minutos a 1600 g y resuspendidas en 5 M1 de solución reguladora de Ph de fosfato (Ph 6.0) que contiene sorbitol 0.6 Ml, manitol 0.6 M, celulosa al 4% (peso/volumen) (Calbiochem), macerasa al 2% (peso/volumen) (Calbiochem) y 50 unidades de pectinasa (Sigma). La suspensión celular fue incubada a 25°C por 16 horas en la oscuridad con sacudimiento moderado. Los protoplastos resultantes fueron recuperados mediante centrifugación a 400 g por 5 minutos. La pelotilla fue resuspendida suavemente en 5 Ml de medio f/2 que contiene sorbitol 0.6 M y manitol 0.6 M y centrifugada en 400 g durante 5 minutos. Esta pelotilla fue resuspendida en 1 Ml de solución de sorbitol/manitol 0.6 M que contiene mMCaC_{12}. 50 mL. Luego, se agregaron 5 mg de ADN de transgen, junto con 25 µg de ADN de timo de becerro (Sigma), a 10^7-10^8 protoplastos en 0.4 Ml. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 200 µL de PNC (polietilenglicol 4000, al 40%, NaCl 0.8 M, $CaCl_2$ 50 Mm) y mezclados moderadamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, 0.6 ml de medio f/2 complementado con solución de sorbitol/manitol 0.6 M, extracto de levadura al 1% y glucosa al 1% fueron agregados y las células transformadas fueron incubadas a 25°C por 12 horas

en la oscuridad para la regeneración de pared celular. Un método similar fue usado por Huang et al. (2007) (supra) para introducir un transgen que codifica reductasa mercúrica a Chlorella sp. DT.

La electroporación también se ha empleado para transformar Chorella. Como se reporta por Maruyama et al. (2004), Biotechnology Techniques 8:821-826 (incorporada por referencia en la presente en su totalidad), esta técnica fue usada para introducir un transgen a protoplastos de Chlorella saccharophila c-211-1 preparados de las células en la fase estacionaria. La expresión transitoria del plásmido introducido fue observada bajo una intensidad de campo de entre 600 y 900 V/cm, y una duración de impulso de alrededor de 400 ms, en donde se determinó la alta permeabilidad de membrana a 70-kDa FITC-dextrana.

Ejemplos de expresión de transgenes en Chlorella se pueden encontrar en la literature (véase, por ejemplo Current Microbiology Vol. 35 (1997), pp. 356-362; Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2000 Jul;16(4):443-6; Current Microbiology Vol. 38 (1999), pp. 335-341; Appl Microbiol Biotechnol (2006) 72: 197-205; Marine Biotechnology 4, 63-73, 2002; Current Genetics 39:5, 365-370 (2001); Plant Cell Reports 18:9, 778-780, (1999); Biologia Plantarium 42(2): 209-216, (1999); Plant Pathol. J 21(1): 13-20, (2005)). También véanse ejemplos en la presente.

Ejemplos de expresión de transgenes en levadura

oleaginosa (por ejemplo, Yarrowia lipolytica) se pueden encontrar en la literatura (véase, por ejemplo, Bordes et al., J Microbiol Methods, Jun 27 (2007)). Ejemplos de expresión de transgenes en hongos (por ejemplo, Mortierella alpine, Mucor circinelloides, y Aspergillus ochraceus) también se pueden encontrar en la literature (véase, por ejemplo Microbiology, JuI; 153(Pt. 7):2013-25 (2007); MoI Genet Genomics, Jun; 271(5):595-602 (2004); Curr Genet, Mar;21(3):215-23 (1992); Current Microbiology, 30(2):83-86 (1995); Sakuradani, NISR Research Grant, "Studies of Metabolic Engineering of Useful Lipid-producing Microorganisms" (2004); y PCT/JP2004/012021). Ejemplos de expresión de genes exógenos en bacterias tales como E. coli son bien conocidos; véase, por ejemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press.

Vectores para transformación de microorganismos de acuerdo con la presente invención pueden ser preparados mediante técnicas conocidas familiares a aquéllos experimentados en el arte. La secuencia de nucleótidos del constructo usado para transformación de múltiples especies de Chlorella corresponde a SEQ ID NO:25. En una modalidad, un diseño de vector ejemplar para expresión de un gen de lipasa en un microorganismo tal como una microalga contiene un gen que codifica una lipasa en enlace operable con un promotor activo en microalgas. Alternativamente, si el vector no contiene un

promotor en enlace operable con el gen de interés, el gen puede ser transformado a la célula, de tal manera que es enlazado operativamente a un promotor endógeno en el punto de integración del vector. El método de transformación sin promotor ha probado funcionar en microalgas (véase, por ejemplo Plant Journal 14:4, (1998), pp.441-447). El vector puede también contener un segundo gen que codifica una proteína que por ejemplo imparte resistencia a un antibiótico o herbicida, esto es, un marcador seleccionable. Opcionalmente, uno o ambos genes son seguidos por una secuencia sin traducir 3' que contiene una señal de poliadenilación. Cassettes de expresión que codifican los dos genes pueden ser enlazados físicamente en el vector o sobre vectores separados. También se puede usar la co-transformación de microalgas en la cual moléculas de vector distintas son usadas simultáneamente para transformar células (véase, por ejemplo Protist 2004 Dec; 155(4):381-93). Las células transformadas pueden ser opcionalmente seleccionadas en base a la habilidad para crecer en presencia del antibiótico u otro marcador seleccionable bajo condiciones en las cuales las células que carecen del cassette de resistencia no crecerían.

Todas las referencias citadas en la presente, en las que se incluyen Patentes, Solicitudes de Patentes y Publicaciones son incorporadas por referencia en la presente en su totalidad, ya sea previamente incorporadas específicamente o no. Las publicaciones mencionadas en la presente son citadas

por el propósito de describir y revelar reactivos, metodologías y conceptos que pueden ser usados en relación con la presente invención. Nada en la presente será interpretado como admisión de que estas referencias son arte previo en relación con la invención descrita en la presente.

Aunque esta invención ha sido descrita en relación con modalidades específicas de la misma, se comprenderá que es apta de modificaciones adicionales. La presente solicitud se propone cubrir cualesquier variaciones, usos o adaptaciones de la invención que siguen en general los principios de la invención y que incluyen tales desviaciones de la presente revelación como entren en la práctica conocida o acostumbrada en el arte con la cual la invención es concerniente y como puedan ser aplicadas a los elementos esenciales resumidos anteriormente en la presente.

X. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar pero no limitar la invención reivindicada.

EJEMPLO 1

Cepas de Chlorella de la colección de cultivo dela Universidad de Texas fueron probadas en cuanto a crecimiento sobre glicerol y glucosa. Las siguientes especies y cepas de Chlorella fueron cultivadas: Chlorella kessleri (cepas 263,

397, 398, 2228); Chlorella sorokiniana (cepas 1663, 1665, 1669, 1671, 1810); Chlorella saccharophila (2911; 2469); Chlorella protothecoides (31, 249, 250, 264). Cada cepa fue inoculada del medio sólido a un medio a base de líquido de 25 ml (2g/L de extracto de levadura, $NaNO_3$ 2.94mM, $CaCl_2$'$2H_2O$ 0.17mM, $MgSO_4$«$7H_2O$ 0.3mM, $K_2HPO_4$0.4mM, KH_2PO_4 1.28mM, NaCl 0.43mM) y cultivadas con agitación a 27°C durante 72 horas bajo una intensidad de luz de 75 75µEm~V[1]. Estos cultivos fueron usados para inocular cada cepa a una densidad final de $1x10^5$ células/ml en placas de 24 cavidades que contienen 2 ml de (a) medios de base solamente (b) medios de base más glucosa al 0.1% y (c) medios de base mas glicerol grado reactivo al 0.5% (EM Science, catalog #GX0185-6). Las placas fueron colocadas en la oscuridad y cultivadas durante 72 horas con agitación a 27°C. Las muestras de cada cepa cultivada en las tres condiciones fueron diluídas 1.9:1 en Samples of each strain grown in the three conditions were diluted 1.9:1 en H_2O destilada y la absorbancia fue leída a 600 nm en un Molecular Devices SpectraMax 340PC. Todas las cepas exhibieron crecimiento en presencia de glucosa y glicerol en comparación a solamente medios de base.

EJEMPLO 2

Cepas y medios: Chlorella protothecoides #1 (CEPA 250), #2 (CEPA 264) y Chlorella kessleri #1 (CEPA 398) fueron

obtenidos de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, USA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de Proteosa modificado. El medio de Proteosa modificado consistía (en g/L) de 0.25 g de $NaNO_3$, 0.09 g de K_2HPO_4, 0.175 g de KH_2PO_4, 0.025 g de $CaCl_2$-$2H_2O$, 0.075 g de $MgSO_4$-$7H_2O$ y 2 g de extracto de levadura por litro. Se obtuvieron desperdicios de glicerol de la producción de biodiesel (glicerol acidulado (AG)) y glicerol sin acidular (NAG) de Imperial Western Products (Selma, CA, USA). El glicerol "puro" o "grado reactivo" fue de EM Science (una división de Merck KGA), número de catálogo #GX0185-6.

Diseño experimental y medición de crecimiento: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteasa + glicerol puro al 1%

2. Proteasa + glicerol acidulado al 1%

3. Proteasea + glicerol sin acidular al 1%

4. Proteasa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas).

5. Proteasa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

6. Proteasa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas).

Cada cepa fue inoculada a diferentes medios a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron

mantenidos en la oscuridad y fueron agitados por el sacudidor orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 72 horas de cultivo inicial, se agregó glucosa al 1% (peso/volumen) a las muestras de #4, 5, y 6 y cultivadas otras 24 horas. Para medir el peso seco de célula, 1 ml de cada cultivo fue aglomerado mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5415C. Después de remover el sobrenadante, las pelotillas celulares fueron congeladas a -80°C y liofilizadas en un secador por congelación a escala de laboratorio (Labconco, MO, Estados Unidos de América). Los resultados son mostrados en la Figura 1.

EJEMPLO 3

Cepas y medios: Chlorella protothecoides #1 (CEPA 250), #3 (CEPA 249) y Chlorella kessleri #2 (cepa 397) fueron obtenidas de la Colección de Cultivo de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2).

Diseño experimental y medición de crecimiento: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1%

2. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%

3. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%.

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados por el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas, el crecimiento celular fue medido mediante el peso seco de célula (véase EJEMPLO 2). Los resultados son mostrados en la Figura 2.

EJEMPLO 4

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #3 (CEPA 249), #4 (CEPA 31) y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron obtenidos de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos en un medio de Proteosa modificado (véase EJEMPLO 2)

Diseño experimental y análisis de lípido: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1%

2. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%

3. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen diferentes gliceroles (puro, acidulado o sin acidular) a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitador por el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas, se midió el contenido de lípido. Para medir la cantidad de contenido de lípido en las células, 100 µl de cultivos fueron recolectados y lavados una vez con el mismo volumen de medios. A cada tubo, se agregaron 5 µl de células lavadas y 200 µl de ácido sulfúrico 18 M. Los tubos fueron incubados a 90°C en un baño de agua durante 30 minutos y se agregó 1 ml de ácido reactivo de fosfórico-vanillina a los tubos e incubados a 37°C por 15 minutos. Para preparar el reactivo de ácido fosfórico-vanillina reactivo, se agregaron 0.12 g de vanillina a 20 ml de agua y el volumen fue ajustado a 100 ml con ácido fosfórico al 85%. La densidad óptica a 530 nm fue medida en una cubeta de vidrio contra un tubo de referencia con 5 µl de agua como muestra. Los resultados son mostrados en la Figura 3.

EJEMPLO 5

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #2 (CEPA 264) y *Chlorella kessleri* #1 (CEPA 398) fueron obtenidos de la Colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2).

Diseño experimental y análisis del lípido: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1%

2. Proteosa + glicerol sin acidular al 1%

3. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

4. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregado después de 72 horas).

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen diferentes gliceroles (puro o sin acidular) a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% a la muestra #3 y #4 y cultivada otras 24 horas. El contenido de lípido fue medido en todas las muestras (véase EJEMPLO 4). La densidad óptica a 600 nm fue también medida para verificar en cuanto a absorbancia no específica y restada de O. D. 530 nm para calcular la cantidad de lípido. La curva de referencia está compuesta de trioleína disuelta en cloroformo que fluctúa de 1 a 10 µg. Los resultados son mostrados en la Figura 4.

EJEMPLO 6

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #3 (CEPA

249) y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron obtenidas de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: Para cada cepa, se preparo 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregado después de 72 horas)

2. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

3. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen diferentes gliceroles (puro, acidulado o sin acidular) a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% y fue cultivado otras 24 horas. El peso seco de célula y contenido de lípido fueron medidos en todas las muestras (véase EJEMPLOS 2 y 5). El porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de lípido total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la Figura 5.

EJEMPLO 7

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #2 (CEPA 264) y *Chlorella kessleri* #1 (CEPA 398) fueron obtenidos de la Colección de Cultivo de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

2. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada con medios que contienen ya sea glicerol puro al 1% o glicerol sin acidular al 1% a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% y fue cultivado otras 24 horas. El peso seco de célula y contenido de lípido fueron medidos en todas las muestras (véanse EJEMPLOS 1 y 4). El porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de lípido total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la Figura 6.

EJEMPLO 8

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #1 (CEPA 250), #4 (CEPA 31) y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron obtenidas de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2)

Diseño experimental y análisis de lípido: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en las placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glucosa al 2%

2. Proteosa + glicerol al 1% + glucosa al 1%

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados por un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas de crecimiento inicial, el contenido de lípido fueron medido (véase EJEMPLO 5). Los resultados son mostrados en la Figura 7.

EJEMPLO 9

Cepas y medios: *Chlorella protothecoides* #3 (cepa 249), #4 (cepa 31) y *Chlorella kessleri* #1 (cepa 398) fueron obtenidos de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un

medio de proteosa modificado (vease ejemplo 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: para cada cepa, se preparó 1ml de los siguientes medios en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glucosa al 2%
2. Proteosa + glicerol 1% + glucosa al 1%
3. Proteosa + glicerol 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 72 hrs de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% (peso/volumen) al medio número 3 y cultivados otros 24 hrs. Se midieron el peso seco de células y el contenido de lípidos en todas las muestras (véanse ejemplos 2 y 5). El porcentaje de lípidos fue calculado a partir de la cantidad total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la figura 8.

EJEMPLO 10

Cepas y medios: *Chlorella protothecoides* #1 (cepa 250), #3 (cepa 249) y *Chlorella kessleri* #2 (cepa 397) fueron obtenidos de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un

medio de proteosa modificado (vease ejemplo 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: para cada cepa, se preparó 1ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1%
2. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)
3. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
4. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)
5. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
6. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 72 hrs de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% (peso/volumen) al medio número 2, número 4 y número 6 y cultivados otras 24 hrs. El contenido de lípido fue medido en todas las muestras (véanse ejemplos 4). Los resultados son mostrados en la figura 9.

EJEMPLO 11

Cepas y medios: *Chlorella protothecoides* #1 (cepa

250), #3 (cepa 249), #4 (cepa 31) y *Chlorella kessleri* #2 (cepa 397) fueron obtenidos de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (vease ejemplo 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: para cada cepa, se preparó 1ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1%
2. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)
3. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
4. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)
5. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
6. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 72 hrs de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% (peso/volumen) a los medios número 2, número 4 y número 6 y cultivados otras 24 hrs. El peso seco de célula fue medido en todas las muestras (véanse ejemplo 2). Los resultados son mostrados en la figura

10.

EJEMPLO 12

Construcción del vector

Un fragmento de BaMHI-SacII que contiene el promotor CMV, un cADN resistente a higromicina y CMV 3' UTR (SEQ ID NO:5, una subsecuencia del vector pCAMBIA1380, Cambia, Canberra, Australia) fue clonada a los sitios BamHI y SacII de pBluescript y es denominado en la presente como pHyg.

Transformación biolística de Chlorella

Portadores de oro de S550d de Seashell Technology fueron preparados de acuerdo con el protocolo dl fabricante. El plásmido pHyg linealizado (20 μg) fue mezclado con 50 μl de solución reguladora de pH enlace y 60 μl (30mg) de portadores dorados S550d e incubados en hielo durante 1min. Se agregó la solución reguladora del pH de precipitación (100 μl) y la mezcla fue incubada en hielo por otro minuto. Después de haber sido sometidas al vortex, las partículas recubiertas con ADN fueron aglomeradas mediante centrifugación a 10,000rpm en una microfuge Eppendorf5415C durante 10seg. La pelotilla dorada fue lavada una vez con 500 μl de etanol al 100% frío, aglomerada mediante breve centrifugación en la microfuge y re-suspendida con 50 μl de etanol helado. Después de una breve sonificación (1 – 2seg), 10 μl de partículas recubiertas con ADN fueron

transferidas inmediatamente a la membrana del portador.

El cultivo de *Chlorella protothecoides* (Universidad de Texas, colección de cultivos 250) fue cultivado en un medio de Proteosa (2gr/lt de extracto de levadura, $NaNO_3$ 2.94mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.17mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3mM, K_2HPO_4 0.4mM, KH_2PO_4 1.28mM, NaCl 0.43mM) sobre un agitador giratorio bajo una luz continua a 75 μmol fotones m^{-2} s^{-1} hasta que llegó a una densidad celular de $2X10^6$ células/ml. Las células fueron cosechadas, lavadas una vez con agua destilada estéril y resuspendidas en 50 μl de medio. $1X10^7$ células fueron esparcidas en el tercio central de una placa de medios de Proteosa no selectiva. Las células fueron bombardeadas con el sistema de administración de partículas biolístico PDS-1000/He (Bio-Rad). Se utilizaron discos de ruptura (1100 y 1350 psi) y las placas fueron colocadas a 9 y 12 cm debajo del conjunto tamiz/macroportador. Se permite que las células se recuperen a 25°C durante 12 – 24 hrs. Después de la recuperación, las células fueron raspadas de las placas con una espátula de hule o caucho, mezcladas con 100 μl del medio y esparcidas sobre placas que contienen higromicina (200 μg/ml). Después de 7 – 10 días de incubación a 25°C, colonias que representan células transformadas fueron visibles sobre las placas de los discos de ruptura de 1100 y 1350 libras fuerza/pulgada^2 y de distancia de 9 y 12 cm. Las colonias fueron recolectadas y sembradas sobre placas de agar selectivas para una segunda ronda de selección.

Transformación de *Chlorella* mediante Electroporación

El cultivo de *Chlorella protothecoides* fue cultivado en un medio de Proteosa sobre u agitador giratorio bajo luz continua a sobre un agitador giratorio bajo una luz continua a 75 μmol fotones m^{-2} s^{-1} hasta que llegaron a una densidad celular de $2X10^6$ células/ml. Las células fueron cosechadas, lavadas una vez con agua destilada estéril y resuspendidas en una solución reguladora del pH de Tris-fosfato (Tris-HCl 20mM, pH 7.0; fosfato de potasio 1mM) que contiene sacarosa 50mM a una densidad de $1X10^8$ células/ml. Una suspensión de aproximadamente 250 μl de células ($1X10^8$ células) fue colocada en una cubeta de electroporación desechable de un espacio de 4mm. A la suspensión celular, 5 μg de ADN del plásmido pHgy linealizado y 200 μg de ADN portador (ADN de esperma de salmón sometido a esfuerzo constante) fueron agregados. Luego, la cubeta de electroporación fue incubada en un baño de agua a 16°C por 10min. Luego se aplicó un impulso eléctrico (1100 V/cm) a la cubeta a un capacitancia de 25 μF (no se utilizó ningún receptor de derivación para la electroporación) utilizando un aparato de electroporación Gene Pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA). Luego la cubeta fue incubada a temperatura ambiente durante 5min, seguido de lo cual la suspensión celular fue transferida a 50 ml de medio de Proteosa y agitada sobre un agitador giratorio por 2 días. En seguida de

la recuperación, las células fueron cosechadas mediante centrifugación a baja velocidad, resuspendidas en medios de Proteosa y depositada a baja densidad sobre placas complementadas con 200 μg/ml de higromicina. Las placas fueron incubadas bajo luz continua a 75 μmol fotones m^{-2} s^{-1}. Los transformantes, aparecieron como colonias en 1 – 2 semanas. Las colonias fueron recolectadas y sembradas sobre placas de agar selectivas para una segunda ronda de selección.

Genotipo

Un subconjunto de colonias que sobrevivieron a una segunda ronda de selección fueron cultivadas en un volumen pequeño y cosechadas. Pelotillas de aproximadamente 5 – 10 μl de volumen fueron resuspendidas en 50μl de NaEDTA 10mM mediante vórtice y luego incubadas a 100°C por 10. Los tubos fueron luego sometidos a vórtice brevemente y sonificados por 10seg, luego centrifugados a 12,000 xg por 1min. Se usaron 2 μl de sobrenadante como plantilla en una reacción de PCR de 50μl. los cebadores usados para el genotipo fueron SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7. Las condiciones de PCR fueron como sigue: 95°C 5min x 1 ciclo; 95°C 30 seg – 58°C 30 seg – 72°C, 1min, 30 seg x 35 ciclos; 72°C 10min x 1 ciclo. El fragmento de 992 pb esperado fue encontrado en 6 de 10 colonias del método biolístico y de una sola colonia de electroporación. Una banda de tamaño menor, no específica estuvo presente en todos los carriles. Los

resultados son mostrados en la figura 16. Para confirmar la identidad de los fragmentos de 992pb amplificado, dos bandas biolísticas y la banda de electroporación fueron extirpadas del gel y secuenciadas individualmente. La secuencia de todas las tres bandas correspondía al fragmento de 992pb esperado. (DNA ladder:Bionexus® All Purpose Hi-Lo® DNA ladder catalog#BN2050).

EJEMPLO 13

Cepas y medios: a) *Spirulina platensis* (UTEX 2340)y b) *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) fueron obtenidos de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). El cultivo concentrado de *Spirulina* fue mantenido en medio de Spirulina y *Navicula* fue mantenida en un medio de extracto de suelo (SEM). El medio de Spirulina consistía de $NaHCO_3$ 162mM, Na_2CO_3 38mM, K_2HPO_4 1.9mM, $NaNO_3$ 29mM, K_2SO_4 5.75mM, NaCl 17.1mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.25mM, Na_2EDTA 2mM, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.36mM, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.21mM, $ZnCl_2$ 0.037mM, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0085mM, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.017, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.78μM, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15μM, H_3BO_3 10μM y vitamina B_{12} 0.001mM. El medio de extracto de suelo consiste de $NaNO_3$ 2.94Mm, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.17mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3mM, K_2HPO_4 0.43mM, KH_2PO_4 1.29mM, NaCl 0.43mM y extracto de suelo. Los desperdicios de glicerol de la producción de biodiesel (glicerol acidulado (AG) y glicerol sin acidular (NAG) fueron obtenidos de Imperial Western Products (Selma, CA, USA).

Diseño experimental y medición de crecimiento: para cada cepa, se preparó 1ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

a)

7. Medio de Spirulina + glucosa al 2%
8. Medio de Spirulina + glicerol grado reactivo al 2%
9. Medio de Spirulina + glicerol sin acidular al 2%
10. Medio de Spirulina + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%

b)

1. SEM + glucosa al 2%
2. SEM + glicerol grado reactivo al 2%
3. SEM + glicerol grado reactivo al 1% + glucosa al 1%
4. SEM + glicerol acidulado al 2%
5. SEM + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
6. SEM + glicerol sin acidular al 2%
7. SEM + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 96 hrs se midió el contenido de lípido. Para medir la cantidad de contenido de lípido en las células, se recolectaron 100µl de cultivos de lavados una vez con el mismo volumen de medios. A cada tubo, se agregaron 5µl de células lavadas y 200µl de ácido

sulfúrico 18M. los tubos fueron incubados a 90°C en un baño de agua por 10min y se agregaron 1ml de reactivo de ácido fosfórico-vanillina a los tubos e incubados a 37°C por 15min. Para preparar el reactivo de ácido fosfórico- vanillina se agregaron 0.12 g de vanillina a 20ml de agua y el volumen fue ajustado a 100ml con acido fosfórico al 85%. La densidad óptica a 530nm fue leída en una cubeta de vidrio contra un tubo e referencia con 5μl de agua como muestra. La curva de referencia está compuesta de Trioleina disuelta en cloroformo que fluctúa de 1 a 10μg.

Para medir el peso seco de célula, 0.5ml de cada cultivo fueron aglomerados mediante centrifugación a 5000rpm por 5min. Después de remover el sobrenadante, las pelotillas celulares fueron congeladas a -80°C y secadas durante toda la noche en un sistema de secado por congelación (Labconco, MO, Estados Unidos de América). El porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de lípido total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la figura 11.

EJEMPLO 14

Cepas y medios: a) *Scenedesmus armandus* (UTEX 2552) fue obtenido de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre

medio de Proteosa modificado. El medio de Proteosa modificado consistía (g/L) de 0.25g de $NaNO_3$, 0.09g de K_2HPO_4, KH_2PO_4, 0.025g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.075g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 2g de extracto de levadura por litro.

Diseño experimental y medición de crecimiento y de lípido: para cada condición de cultivo, se preparó 1ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

a), b)

1. Proteosa + glucosa al 2%
2. Proteosa + glicerol 2%
3. Proteosa + glicerol acidulado al 2%
4. Proteosa + glicerol sin acidular al 2%
5. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%

Scenedesmus armandus (UTEX 2552) fue inoculado a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados por el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 96 hrs se crecimiento celular fue medido por el peso seco de célula y el contenido de lípido fue medido mediante el análisis de fosforo-vanillina (vease ejemplo 13). El porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad total de lípido dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la figura 12.

EJEMPLO 15

Cepas y Medios: *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) fue obtenido de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de extracto de suelo (véase EJEMPLO 13).

Diseño experimental y medición de crecimiento: Para cada condición de cultivo, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. SEM + glucosa al 2%
2. SEM + glicerol al 2%
3. SEM + glicerol acidulado al 2%
4. SEM + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
5. SEM + glicerol sin acidular al 2%
6. SEM + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%.

Navicula pelliculosa (UTEX 667) fue inoculado a medios que contienen glucosa o diferentes gliceroles (puro, acidulado o sin acidular) a una concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados por un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas, el crecimiento celular fue medido mediante el peso seco de célula (véase EJEMPLO 13). Los resultados son mostrados en la Figura 13.

EJEMPLO 16

Cepas y Medios: *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) y

Navicula pelliculosa (UTEX 667) fueron obtenidos de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado para *Scenedesmus armatus* y medio de extracto de suelo para *Navicula pelliculosa* (véase EJEMPLO 1).

Diseño experimental y medición de crecimiento: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

Scenedesmus armatus

5. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%

6. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregado después de 72 horas)

Navicula pelliculosa

1. SEM + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%

2. SEM + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregado después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% a la muestra #2 y fue cultivada otras 24 horas. El crecimiento celular fue medido mediante peso seco de célula (véase EJEMPLO 13). Los resultados

son mostrados en la Figura 14.

EJEMPLO 17

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) fue obtenido de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 1).

Diseño experimental: Para cada condición, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

4. Proteosa
5. Proteosa + glucosa al 0.5%
6. Proteosa + xilosa al 0.5%
7. Proteosa + glucosa al 0.25% + xilosa al 0.25%.

Chlorella protothecoides #4 (UTEX 31) fue inoculado a medios que contienen diferentes azúcares (glucosa o xilosa) a una concentración de 3 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados por un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento, el crecimiento celular fue medido al contar los números de células de cada cultivo. Los resultados son mostrados en la Figura 15.

EJEMPLO 18

Las cepas #1, #3 y #4 de *Chlorella protothecoides* fueron obtenidas de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 1). Para cada condición, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa
2. Proteosa + glucosa al 1%
3. Proteosa + fructosa al 1%

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen azúcares diferentes (glucosa o fructosa) a una concentración de 1 x 10^6 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas de crecimiento, la densidad celular fue medida al contar los números de células de cada cultivo. Los resultados son mostrados en la Figura 20.

EJEMPLO 19

Chlorella sobre Sacarosa

Materiales y métodos: *Chlorella protothecoides* (UTEX 249) fue inoculada a tres matraces de 50 ml de medio de proteosa con sacarosa al 1% (2.94 mM $NaNO_3$, 0.428 mM K_2HPO_4, 1.28 mM KH_2PO_4, 0.427 mM NaCl, 0.17 mM $CaCl_2$-$2H_2O$, 0.3 mM $MgSO_4$-$7H_2O$, Proteosa peptona 1 g/L) a una densidad celular final de 4

x 10^5 células por ml. Se agregó invertasa (Sigma #14504) a dos de los cultivos a 0.01 U/ml y 0.05 U/ml. Todos los tres cultivos fueron cultivados en la oscuridad por ~60 hrs agitando a 150rpm.

Resultados: Se efectuaron conteos de células finales en todos los tres cultivos después de ~60 hrs de agitación en la oscuridad. El matraz de control o testigo llegó a $4.4x10^5$ células por ml en tanto que los matraces de 0.01 U/ml y 0.05 U/ml llegaron a densidades celulares de $1x10^8$ y $3x10^8$ respectivamente. Cada matraz fue verificado en cuanto a contaminación al final del experimento mediante análisis microscópico y todos estuvieron limpios.

EJEMPLO 20

Cepas de Chlorella que crecen sobre sacarosa

Cultivos de Chlorella kessleri ((a) UTEX 397 y (b) UTEX 398) y Chlorella fusca ((a) UTEX 251 y(b) UTEX 1801) fueron inoculados de cultivos líquidos autotrópicos a 10 ml de medio de proteosa + sacarosa al 1% en matraces de 50 ml a una concentración de 1 x 10^6 células/ml. También se inocularon cultivos de control a la misma densidad con solamente medios de proteosa. Los cultivos fueron cultivados a 200°C en la oscuridad sacudiendo a 250 rpm por 7 días, punto en el cual la densidad celular fue medida mediante hemocitómetro. Como se muestra en las Figuras 21-22, todas las cuatro cepas crecieron

sobre sacarosa en comparación con la densidad celular inicial y el control de solamente proteosa.

EJEMPLO 21

Crecimiento de Chlorella protothecoides sobre melasas con una invertassa de sacarosa.

Preparación de células de Chlorella para inoculación: Se inició un cultivo de líquido de 10 ml de Chlorella tomando el inóculo de una placa de proteosa sólida. Los cultivos fueron cultivados en la luz por aproximadamente 2 días a 26°C. El crecimiento fue medido utilizando un densitómetro óptico (OD) a 750 nm y al determinar los pesos secos de células.

Preparación de melasa y soluciones concentradas de azúcar: Una solución concentrada al 5% fue preparada con glucosa, sacarosa y 3 muestras de melasas diferentes (marcadas como BSl, BS2 y HTM) obtenidas del proceso comercial de caña de azúcar a azúcar, como se muestra en la siguiente Tabla 13. El pH de todas las soluciones concentradas fue verificado para estar en el intervalo de 6-6.6 y luego las soluciones concentradas fueron sometidas a autoclave.

Tabla 13. Melasas y soluciones de azúcar

Melasas	% de azúcar	azúcar al 5% diluido en 100 ml
		gramos o ml
HTM	78.72	6.4
BS1 (FL)	44.25	11.3
BS2 (AU)	51.55	9.7
Sacarosa	100	5
Glucosa	100	5

Preparación de Solución de Invertasa: Una solución concentrada de 40 unidades/ml de invertasa fue preparada al reconstituir 1 mg de una invertasa de 400 unidades/mg (Sigma) en 10 ml de agua destilada.

Condiciones experimentales y montajes: Se prepararon cultivos de 10 ml, cada uno que consiste de una concentración final de melasas/azúcar de 1%, 0.05 unidades/ml de invertasa y $1.0x10^6$ células por ml de Chlorella protothecoides en un medio de proteasa base. Los cultivos fueron numerados como sigue: (1) medios de control solamente; (2) 1% HTM; (3) 1% BSl ; (4) 1% BS2; (5) glucosa al 1%; y (6) sacarosa al 1%. También se preparó un conjunto de control similar sin la adición de invertasa. Los cultivos fueron cultivados en la oscuridad por 5 días agitando a 250 rpm a 28°C.

Resultados: El crecimiento las células de Chlorella protothecoides fue evaluado enseguida de los 5 días de incubación sobre la materia prima de alimentación respectiva en

la oscuridad. Como se muestra en las Figuras 23-24, las células pueden ser cultivadas en melasas en presencia de una invertasa de sacarosa con rendimientos comparables a aquéllos del cultivo sobre glucosa grado reactivo pura.

EJEMPLO 22

Diseño genético de Chlorella protothecoides para expresar una Invertasa de Sacarosa Exógena.

Cepas y Medios: Chlorella protothecoides (UTEX 250) fue obtenido de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre medio de proteosa modificado. El medio de proteosa modificado consiste de 0.25 g de $NaNO_3$, 0.09 g de K2HPO_4, 0.175 g de KH2PO_4, 0.025 g de $CaCl_2$-2H_2O, 0.075 g de $MgSO_4$-7H_2O, y 2 g de extracto de levadura por litro (g/L).

Construcción del plásmido: Para expresar la forma secretada de invertasa en Chlorella protothecoides, un gen SUC2 de Saccharomyces cerevisiae fue colocado bajo el control de tres promotores diferentes: promotor 35S de Virus de Mosaico de Coliflor (CMV), promotor de virus de Chlorella (NC-IA) y promotor HUPl de Chlorella. Un gen SUC2 de levadura fue sintetizado para acomodar el uso de codón optimizado por C. protothecoides e incluye una secuencia de señal requerida para dirigir la secreción extracelular de invertasa. Cada

constructo fue integrado en pBluescript KS+, y EcoRI/AscI, Ascl/Xhol, y XhoI/BamHI y sitios fueron introducidos a cada promotor, gen de invertasa y CMV 3'UTR, respectivamente, mediante amplificación de PCR utilizando cebadores específicos. Productos de PCR purificados fueron clonados secuencialmente. Una ilustración de los constructos finales es mostrado en la Figura 25.

Transformación de Chlorella protothecoides: Un cultivo de Chlorella protothecoides fue cultivado en medio de proteasa modificado sobre un agitador giratorio bajo luz continua a 75 µmol fotones m^{-2} S^{-1} hasta que alcanzó una densidad celular de $6x10^6$ células/ml.

Para transformación biolística, portadores dorados de S550d de Seashell Technology fueron preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, un constructo linealizado (20 µg) mediante Bsal fue mezclado con 50 µl de solución reguladora del enlace y 60 µl (3 mg) de portadores dorados S550d e incubados en hielo por 1 minuto. Se agregó solución reguladora de pH de precipitación (100 µl) y la mezcla fue incubada en hielo por otro 1 minuto. Después de vórtice moderada, las partículas recubiertas con AND fueron aglomeradas mediante centrifugación a 10,000 rpm en una microfuga de Eppendorf por 10 segundos. La pelotilla dorada fue lavada una vez con 500 µl de etanol al 100% frío, aglomeradas mediante breve centrifugación en la microfuga y resuspendida con 50 µl

de etanol helado. Después de una breve solidificación (1-2 segundos), 10 µl de partículas recubiertas con ADN fueron transferidas inmediatamente a la membrana portadora. Las células fueron cosechadas, lavadas una vez con agua destilada estéril, resuspendidas en 50 µl del medio (1 x 10^7 células) y fueron esparcidas en el tercio central de una placa proteosa no selectiva. Las células fueron bombardeadas con el sistema de administración de Partículas Biolísticas PDS-1000/He (Bio-Rad). Se usaron discos de ruptura (1100 y 1350 psi) y las placas fueron colocadas 9-12 cm debajo del conjunto de tamiz/macroportador. Se permite que las células se recuperen a 25°C durante 12-24 horas. Después de la recuperación, las células fueron raspadas de las placas con una espátula de hule o caucho, mezcladas con 100 µl de medio y esparcidas sobre placas de proteosa modificada con sacarosa al 1%. Después de 7-10 días de incubación a 25°C en la oscuridad, colonias que representan células transformadas fueron visibles sobre las placas.

Para transformación con electroporación, las células fueron cosechadas, lavadas una vez con agua destilada estéril y resuspendidas en una solución reguladora de pH de Tris- fosfato (Tris-HCl 20 mM pH 7.0; fosfato de potasio 1 mM) que contiene sacarosa 50 mM a una densidad de 4x10^8 células/ml. Aproximadamente 250 µl de suspensión celular (1x10^8 células) fue colocada en una cubeta de electroporación desechable de

espacio de 4 mm. A la suspensión celular, se agregaron 5 µg de AND de plásmido linealizado y 200 µg de ADN portador (ADN de esperma de salmón sometido a esfuerzo cortante). Luego la cubeta de electroporación fue incubada en un baño de agua helada a 16°C por 10 minutos. Luego se aplicó un impulso eléctrico (1100 V/cm) a la cubeta a una capacitancia de 25 µF (no se utilizó ningún resistor de derivación para la electroporación) utilizando un aparato de electroporación Gene Pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA). Luego la cubeta fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, enseguida de lo cual la suspensión celular fue transferida a 50 ml de medio de proteosa modificada y agitada sobre un agitador giratorio por 2 días. Enseguida de la recuperación, las células fueron cosechadas a baja velocidad (4000 rpm), resuspendidas en medio de proteosa modificado y depositadas a baja densidad sobre placas de proteosa modificadas con sacarosa al 1%. Después de 7-10 días de incubación a 25°C en la oscuridad, colonias que representan células transformadas fueron visibles sobre las placas.

Selección de Transformantes y Genotipos: Las colonias fueron proyectadas de placas de proteosa modificadas cultivadas en la oscuridad con sacarosa al 1% y aproximadamente la misma cantidad de células fueron transferidas a placas de 24 cavidades que contienen un 1 ml de medio líquido de proteosa modificada con sacarosa al 1%. Los cultivos fueron mantenidos

en la oscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm durante 5 días.

Para verificar la presencia del gen de invertasa introducido en transformantes de Chlorella, el ADN de cada transformante fue aislado y amplificado con un conjunto de cebadores gen específico (constructo de CMV: cebador delantero (CAACCACGTCTTCAAAGCAA) (SEQ ID NO:6)/ cebador inverso (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO:9), constructos de CV: cebador delantero (TTGTCGGAATGTCATATCAA) (SEQ ID NO: 10)/ cebador inverso (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO: 11), y constructo de HUPl: cebador delantero (AACGCCTTTGTACAACTGCA) (SEQ ID NO: 12)/ cebador inverso (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO: 13)). Para un aislamiento de ADN rápido, un volumen de células (de aproximadamente 5-10 uL de tamaño) fueron resuspendidos en 50 uL de Na-EDTA 10 mM. La suspensión celular fue incubada a 100°C por 10 minutos y sonificada por 10 segundos. Después de la centrifugación a 12000 g por 1 minuto, se usaron 3 uL de sobrenadante para la reacción de PCR. La amplificación de PCR fue efectuada en un ciclizador térmico de ADN (Perkin-Elmer GeneAmp 9600). La mezcla de reacción (50 uL) contenía 3 uL de ADN extraído, 100 pmol cada uno de los cebadores respectivos descritos anteriormente, dNTP 200 uM, 0.5 unidades de ADN polimerasa de Taq (NEB), y solución reguladora de pH de ADN polimerasa Taq de acuerdo con instrucciones del fabricante. La desnaturación de ADN se llevó a cabo a 95°C por

5 minutos durante el primer ciclo y luego durante 30 segundos. El recocido del cebador y reacciones de extensión se llevaron a cabo a 58°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, respectivamente. Los productos de PCR fueron luego visualizados sobre genes de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. La Figura 26 muestra los resultados del genotipo de PCR de transformantes de C. protothecoides utilizando los cebadores gen específicos identificados anteriormente. Las flechas muestran el tamaño esperado de producto de PCR y las estrellas representan muestras de ADN de cada transformante que muestran el producto de PCR coincidente con el tamaño esperado ((V: Vector solamente, WT: tipo silvestre).

Crecimiento en Cultivo Líquido: Después de cinco días de crecimiento en la oscuridad, los transformantes genotipo-positivos mostraron crecimiento sobre medio de proteosa líquido mínimo + sacarosa al 1% en la oscuridad, mientras que las células tipo silvestre no mostraron crecimiento en el mismo medio en la oscuridad.

EJEMPLO 23

Transformación de cepas de algas con una invertasa de S. cerevisiae

Invertasa Secretada: Un gen que codifica una invertasa de sacarosa secretada (número de acceso Gen Bank NP_012104 de Saccharomyces cerevisiae) fue sintetizado de novo

como un fragmento de 1599 bp Asc I-Xho que fue subsecuentemente sub-clonado a un derivado de pUC19 que posee el promotor 35s de Virus de Mosaico de Coliflor y 3' UTR como cassetes de EcoR I/Asc I y Xho/Sac I, respectivamente.

Crecimiento de Células de Algas: Los medios usados en estos experimentos consistían de medios base líquidos (véase EJEMPLO 1) y medios de base sólidos (+ agarosa al 1.5%) que contiene carbono fijo en forma de sacarosa o glucosa (como se designe) a una concentración final de 1%. Las cepas usadas en este experimento no crecieron en la oscuridad sobre medio base en ausencia de una fuente de carbono fijo adicional. Las especies fueron depositadas sobre las placas y cultivadas en la oscuridad a 28°C. Colonias individuales fueron proyectadas y usadas para inocular 500 mL de medio base líquido que contiene glucosa al 1% y se le permite que crezca en la oscuridad hasta fase media-logarítmica, midiendo los conteos celulares cada día. Cada una de las siguientes cepas había sido previamente probada en cuanto a crecimiento sobre sacarosa en la oscuridad como una sola fuente de carbono y no exhibía crecimiento y fueron así excluídas para transformación con una invertasa secretada: (1) Chlorella protothecoides (UTEX 31); (2) Chlorella minutissima (UTEX 2341); y (3) Chlorella emersonii (CCAP 211/15).

Transformación de Células de Algas vía Bombardeo de Partículas: Un cultivo suficiente fue centrifugado para dar

aproximadamente 1-5x10^8 células totales. La pelotilla resultante fue lavada con medio base sin ninguna fuente de carbono fija agregada. Las células fueron centrifugadas otra vez y la pelotilla fue resuspendida en un volumen de medio base suficiente para dar 5x10^7 a 2x10^8 células/ml. 250-1000 µl de células fueron luego depositadas sobre el medio base sólido complementado con sacarosa al 1% y se le permite que seque sobre la placa en una campana estéril. El ADN del plásmido fue precipitado sobre partículas de oro de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Seashell Technology, La Jolla, CA). Las transformaciones se llevaron a cabo utilizando un sistema de administración de partículas BioRad PDS He-1000 utilizando discos de ruptura de 1350 libras fuerza/pulgada^2 (psi) con el conjunto de macroportador ajustado a 9 cm del portador de disco de ruptura. Enseguida de las transformaciones, las placas fueron incubadas en la oscuridad a 28°C. Todas las cepas generaron múltiples colonias transformantes. Las placas de control transformadas sin ningun inserto de invertasa, pero de otra manera preparadas de manera idéntica, no contenían colonias.

Análisis de tranformantes de Chlorella protothecoides: el AND genómico fue extraído de células tipo silvestre de Chlorella protothecoides y colonias transformantes como sigue: las células fueron resuspendidas en 100 ul de solución reguladora del pH de extracción (Tris Cl 87.5 mM, pH

8.0, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0, SDS al 0.25%) e incubadas a 60°C, con mezcla ocasional vía inversión durante 30 minutos. Para PCR, las muestras fueron diluidas 1:100 en Tris Cl 20 mM, pH 8.0.

El Genotipo fue efectuado sobre AND genómico extraído de WT, los transformantes y ADN de plásmido. Las muestras fueron sometidas a genotipo por el gen marcador. Cebadores 2383 (5' CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGC 3') (SEQ ID NO:20) y 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG 3') (SEQ ID NO:21) fueron usados en esta PCR de genotipo. El perfil de PCR usado fue como sigue: desnaturalización a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C-30 segundos, 60°C-30 segundos, 72°C-3 minutos; 72°C-5 minutos. Una banda de tamaño idéntico fue amplificada de los controles positivos (plásmidos) y dos transformantes de Chlorella protothecoides (UTEX 31), como se muestra en la Figura 27.

Análisis de transformante de Chlorella minutissima y Chlorella emersonii: el ADN Genómico fue extraído de WT de Chlorella WT y los transformantes como sigue: las células fueron resuspendidas en 100 ul de solución reguladora del pH de extracción (Tris Cl 87.5 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0, SDS al 0.25%) e incubadas a 60°C con mezcla ocasional vía inversión durante 30 minutos. Para PCR, las muestras fueron diluídas 1:100 en Tris Cl 20 mM, pH 8.0. El Genotipo fue efectuado sobre ADN genómico extraído de WT, los transformantes y ADN de plásmido. Las muestras fueron sometidas a Genotipo en

cuanto al gen marcador. Los cebadores 2336 (5' GTGGCCATATGGACTTACAA 3') (SEQ ID NO:22) y 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG 3') (SEQ ID NO:21) fueron designados como el conjunto de cebador 2 (producto esperado de 1215 bp), en tanto que los cebadores 2465 (5' CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG 3') (SEQ ID NO:23) y 2470 (5' CACCCGTCGTCATGTTCACGGAGCCCAGTGCG 3') (SEQ ID NO:24) fueron designados el conjunto de cebadores 4 (producto esperado de 1442 bp). El perfil de PCR usado fue como sigue: desnaturalización a 94°C por dos minutos; 29 ciclos de 94°C-30 segundos, 60°C-30 segundos, 72°C-1 minuto, 30 segundos; 72°C-5 minutos. Un control de plásmido que contiene la invertasa secretada fue usada como control de PCR. La Figura 28 muestra la transformación de las especies de Chlorella minutissima (UTEX 2341) y Chlorella emersonii (CCAP 21 1/15) de microalgas con el gen que codifica una invertasa secretada.

La secuencia del constructo de invertasa corresponde a SEQ ID NO:25.

EJEMPLO 24

Crecimientos de cepas de algas en comparación con *S. cerevisiae* sobre una materia prima de alimentación celulósica preparada con Celluclast

Cepas y condiciones de cultivo: la cepas de algas utilizadas en este estudio son enlistadas en la tabla 14 a

continuación y fueron cultivadas en medio de Proteosa con material celulósico provisto exógenamente y en algunos casos carbono fijo adicional en forma de glucosa. Se usaron 24 cepas de algas en este estudio, en las que se incluyen 5 géneros diferentes que abarcan 11 especies diferentes de *Chlorella,* dos de *Parachlorella* y *Prototheca* y uno de cada uno de *Bracteococcus* y *Pseudochlorella. Saccharomyces serevisiae* (cepa PJ-69-4A) fue cultivada en medio YPD (por litro, 10g de Bacto-extracto de levadura, 20g Bacto peptona y 20g de glucosa). Tanro las algas como levaduras fueron cultivadas en 28°C en la obscuridad. El crecimiento de esta cepa sobre medio de Proteosa en la obscuridad en ausencia de material celulósico u otro carbono fijo adicional ya sea no ocurrió o fue extremadamente mínimo.

Liberación de glucosa de material celulósico vía tratamiento de despolimerización enzimática: el material de rastrojo de maíz explotado húmedo fue preparado por el National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) al cocinar rastrojo de maíz en una solución de ácido sulfúrico al 1.4% y desaguar la suspensión resultante. Utilizando un analizador de humedad Mettler Toledo Moisture los sólidos secos en el rastrojo de maíz húmedo se determinaron que era de 24%. Una muestra húmeda de 100g fue resuspendida en agua desionizada a un volumen final de 420ml y el pH fue ajustado a 4.8 utilizando NaOH 10N. se agregó Celluclast™ (Novozymas)(una celulasa) a una

concentración final de 4% y la suspensión resultante incubada con agitación a 50°C por 72hrs. El pH de este material fue luego ajustado a 7.5 con NaOH (cambio de volumen despreciable), esterilizado en filtro a través de un filtro de 0.22μm y almacenado a -20°C. Una muestra fue reservada para determinación de concentración de glucosa utilizando un kit a base de hexocinasa de Sigma, como se describe en la presente.

Determinación de concentración de glucosa liberada mediante tratamiento de Celluclast de rastrojo de maíz húmedo: las concentraciones de glucosa fueron determinadas utilizando el reactivo de análisis de glucosa sigma #G3293. Las muestras, tratadas como se resume anteriormente, fueron diluidas 400 veces y se agregaron 40μl a la reacción. Se determinó que la preparación celulósica de rastrojo de maíz contiene aproximadamente 23g/lt de glucosa.

Tabla 14. Cepas de algas cultivadas sobre material prime de alimentación celulósica

Género/especie	Fuente/designación
Bracteoccus minor	UTEX 66
Chlorella ellipsoidea	SAG 2141
Chlorella kessleri	UTEX 1808
Chlorella kessleri	UTEX 397
Chlorella emersonii	CCAP 211/15
Chlorella luteoviridis	SAG 2133
Chlorella luteoviridis	SAG 2198
Chlorella luteoviridis	SAG 2214
Chlorella luteoviridis	UTEX 22
Bracteococcus medionucleatus	UTEX 1244
Chlorella minutissima	CCALA 20024
Chlorella minutissima	UTEX 2341
Chlorella ovalis	CCAP 211/21A
Chlorella protothecoides	CCAP 211/8d
Chlorella protothecoides	UTEX 250
Chlorella saccharophila	UTEX 2911
Chlorella sorokiniana	UTEX 1230
Chlorella sp.	SAG 241.80
Chlorella vulgaris	CCAP 211/11C
Parachlorella kessleri	SAG 12.80
Parachlorella kessleri	SAG 27.87
Prototheca moroformis	UTEX 1441
Prototheca moriformis	UTEX 1434
Pseudochlorella aquatica	SAG 2149

En la tabla 14 y como se usa en la presente, se refiere a la colección de cultivo de alga en la universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América), SAG se refiere a la colección de cultivos de algas en la universidad de Göttingen (Göttingen, Alemania), CCAP se refiere a la colección de cultivos de algas y protozoarios manejado por la Scottish Association for Marine Science (Escocia, Reino Unido de la Gran Bretaña) y CCALA se refiere a la colección de cultivos de laboratorio algal en el Instituto de Botánica (Trebon, República Checa).

Determinación de crecimiento sobre material

celulósico: después del tratamiento enzimático y sacarificación de celulosa a glucosa, xilosa y otros azúcares de monosacárido, el material preparado anteriormente fue evaluado como materia prima de experimentación par el crecimiento de 24 cepas de algas o *S. cerevisiae* en un medio de Proteosa o medio de YPD respectivamente. El medio de Proteosa fue compensado a una concentración final de glucosa de 23 g/l (la concentración final de glucosa generada vía tratamiento celulolítico de rastrojo de maíz), como fue YPD para el cultivo de *S. cerevisiae*, al agregar cantidades variables de glucosa pura y/o material celulósico depolimerizado. Se incluyeron concentraciones variables de material celulósico, proporcionando 0, 12.5, 25, 50 y 100% de la glucosa de 23 g/l en cada medio, los componentes del cual son mostrados en la tabla 15 a continuación. Un ml de los medios apropiados fue agregado a las cavidades de una placa de 24 cavidades. *S. cerevisiae* cultivado heterotróficamente a 28°C en YPD sirvió como inoculo (20µl) para las cavidades de levadura. 20 microlitros de inoculo para las 24 cepas de algas fueron provistos por las células de algas cultivados mixotróficamente en un medio de Proteosa que contiene 20g/l de glucosa.

Tabla 15. Preparaciones de materia prima de alimentación celulósica.

Vol. de YPD 23.1 g/l de glucosa (ml)	Vol. De medio de Proteosa 23.1 g/l de glucosa (ml)	Vol. De 100% de celulósicos compensados al medio de Proteosa (ml)	Vol. De 100% de celulósicos compensados a YPD (ml)	Vol. Final (ml)	Porciento de celulósicos
0	1	0	0	1	0
0	0.875	0.125	0	1	12.5
0	0.75	0.25	0	1	25
0	0.5	0.5	0	1	50
0	0	1	0	1	100
1	0	0	0	1	0
0.875	0	0	0.125	1	12.5
0.75	0	0	0.25	1	25
0.5	0	0	0.5	1	50
0	0	0	1	1	100

YPD, respectivamente para producir medios que contienen el porcentaje indicado de celulósicos. Los medios fueron preparados con el fin obtener una concentración de glucosa final de 23 g/l en todos los casos. El volumen de los medios antes de la adición ya sea de 20µl de levadura o células de algas cultivadas en fase medio-logaritmica fue de 1ml. Las células fueron incubadas dos días en la obscuridad sobre las concentraciones variables de materias primar de alimentación celulósicas a 28°C con agitación (300rpm). El crecimiento fue determinado mediante medición de absorbancia a 750nm en un espectrofotómetro UV. Sorprendentemente, todas las cepas crecieron sobre el material celulósico preparado con Celluclast, incluyendo condiciones de medios en las cuales el 100% del azúcar fermentable fue celulósico-fermentable.

EJEMPLO 25

Crecimiento de 24 cepas de algas y *S. cerevisiae* sobre varias materias primas de alimentación celulósicas preparadas con Accellerase 1000™ y Celluclast™

Cepas y condiciones de cultivo: las cepas de algas usadas en este ejemplo son enlistadas en la tabla 14 (anterior) y fueron cultivadas en un medio de Proteosa más carbono fijo adicional en forma de material celulósico despolimerizado y/o glucosa pura. *Saccharomyces cerevisiae* (cepa pJ69-4a) fue cultivado en un medio de YPD más carbono fijo adicional en forma de material celulósico despolimerizado y/o glucosa pura. Tanto las algas como levaduras fueron cultivadas a 28°C en la obscuridad.

Liberación de glucosa del material celulósico vía tratamiento de despolimerización enzimática: el material de rastrojo de maíz explotado húmedo fue preparado por la National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) al cocinar rastrojo de maíz en una solución de ácido sulfúrico al 1.4% y desaguar la suspensión resultante. También se preparó Pasto varilla por el National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) utilizando el mismo método como para el rastrojo de maíz. Pulpa de remolacha de azúcar, generada vía tratamiento con pectinasa, fue suministrada por Atlantic Biomasa, Inc. Of Frederick, MD. Utilizando un analizador de humedad de Mettler Toledo, los sólidos secos fueron 24% en el rastrojo de maíz húmedo, 26% en

el Pasto varilla y 3.5% en la pulpa de remolacha de azúcar. Una muestra húmeda de 100g de rastrojo de maíz o Pasto varilla fue resuspendida en agua desionizada a un volumen final de 420ml y el pH ajustado a 4.8 utilizando NaOH 10N. Para pulpa de remolacha, 8.8g de sólidos secos fueron traídos a 350ml con agua desionizada y el pH ajustado a 4.8 NaOH 10N. Para todas las materias primas de alimentación, Accellerase 1000™ (Genencor) (un complejo de enzima de celulasa) fue usado a una proporción de 0.25ml de enzima por gramo de biomasa seca. Las muestras fueron incubadas con agitación (110rpm) a 50°C por 72hrs. El pH de este material fue luego ajustado a 7.5 con NaOH (cambio de volumen despreciable), esterilizado en filtro a través de un filtro de 0.22μm y usado en experimentos de cultivo resumidos a continuación. Una muestra fue reservada para la determinación de concentración de glucosa utilizando un kit a base de hexocinasa de Sigma, como se describe posteriormente en la presente. El mismo conjunto de materias primas de alimentación celulósica fue también preparado utilizando Celluclast™ (Novozymes) (una celulasa) como se describe en el ejemplo previo.

Determinación de concentraciones de glucosa en varias materias primas de alimentación celulósicas tratadas con Accellerase 1000: las concentraciones de glucosa fueron determinadas utilizando el reactivo de análisis de Sigma #G3293. Las muestras tratadas como se resume anteriormente,

fueron diluidas 400 veces y se agregaron 40µl a la reacción. Las preparaciones celulósicas de rastrojo de maíz, Pasto varilla y pulpa de remolacha fueron determinadas que contienen aproximadamente 23.6, 17.1 y 13.7 g/l de glucosa respectivamente.

Determinación de crecimientos sobre material celulósico: después de la despolimerización enzimática de fuentes de glucosa, xilosa y otros monosacáridos, los materiales preparados anteriormente fueron evaluados como materias primas de la alimentación para el crecimiento de las 24 cepas de algas enlistadas en la tabla 14 y *S. cerevisiae* en Proteosa o medio de YPD respectivamente. Los medios fueron diseñados para contener una concentración consistente de glucosa en tanto que se hace variar la cantidad de material celulósico derivado de rastrojo de maíz, Pasto varilla o pulpa de remolacha. Un primer conjunto de Proteosa y medio de YPD que contiene 23.6g g/L de glucosa pura, en tanto que un segundo conjunto de medios contenía rastrojo de maíz despolimerizado, Pasto varilla y pulpa de remolacha, cada uno de los cuales contenía 23.6 g/l de glucosa. El Pasto varilla y medios de pulpa de remolacha fueron complementados con 6.5 a 9.9 gr/l de glucosa pura para normalizar la glucosa en todos los medios celulósicos a 23.6 gr/l. un ml del medio apropiado fue agregado a las cavidades de una placa de 24 cavidades. *S. cerevisiae* cultivado heterotróficamente a 28°C en YPD sirvió como inoculo

(20μl) para las cavidades de levadura. Veinte microlitros de inoculo para las 24 cepas de algas fueron provistos por las células de algas cultivadas mixotrópicamente en un medio de Proteosa que contiene 20 g/l de glucosa. Todas las células fueron incubadas dos días en la oscuridad en concentraciones variables de materias primas de alimentación celulósica a 28°C con agitación (300rpm). El crecimiento fue determinado mediante medición de absorbancia a 750nm en un espectrofotómetro UV. Sorprendentemente, todas las cepas de algas crecieron sobre el rastrojo de maíz, Pasto varilla y material de pulpa de remolacha preparado con Accellerase 1000™ o Celluclast™, incluyendo condiciones del medios en las cuales el 100% de azúcar fermentable fue celulósico-derivado. Bajo ninguna combinación de materia prima de alimentación celulósica y enzima de despolimerización *S. cerevisiae* superó el crecimiento en una cantidad equivalente de glucosa pura, indicando que los inhibidores al crecimiento de levadura en el material celulósico hacen un impacto mayor sobre la productividad de la fermentación. Combinaciones de cepas de algas, enzimas de despolimerización y materias primas de alimentación con monosacáridos celulósicos-derivados 100% que superaron el desempeño a glucosa pura 100% son mostradas en la tabla 16.

Tabla 16. Combinaciones de algas, enzimas y materias primas de alimentación

Materia prima de alimentación y enzima de despolimerización	Genero/especie	Fuente /designación
Rastrojo de maíz / Celluclast™	*Bracteococcus minor*	UTEX 66
Pulpa de remolacha/Accellerase™	*Chlorella ellipsoidea*	SAG 2141
Pasto varilla/ Accellerase™	*Chlorella kessleri*	UTEX 252
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Chlorella kessleri*	UTEX 397
Pasto varilla/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2133
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2133
Pasto varilla/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Rastrojo de maíz/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Pulpa de romolacha/ Accellerase™	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Chlorella sp.*	SAG 241.80
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Swithgrass/ Accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Rastrojo de maíz/ Accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Rastrojo de maíz/Celluclast™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Rastrojo de maíz/ Accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1434
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149

EJEMPLO 26

Tamices de utilización de carbono

Cepas y condiciones de cultivo: cultivos de semilla de las varias cepas de microalgas identificadas a continuación fueron iniciados como cultivos líquidos de 1ml en placas de 24

cavidades y fueron cultivadas autotróficamente por 48hrs en la luz, agitando ~350rpm. Las placas fueron ajustadas con un medio de Proteosa solido a base de agarosa al 1.5% que contiene 1% de glucosa, glicerol, xilosa, sacarosa, fructosa, arabinosa, manosa, galactosa o acetato como la única fuente de carbono fijo. Para cada cepa, 5µl de cultivo de la placa de 24 cavidades autotrópica fueron depositados sobre los medios sólidos. Las placas fueron incubadas por 7 días en la oscuridad a 28°C y examinadas en cuanto a crecimiento en comparación con una placa de control que no contiene carbono fijo adicional. El crecimiento fue observado para cada una de las especies probadas con cada materia prima de alimentación respectiva como se muestra en la tabla 17 de a continuación. El crecimiento de estas cepas sobre un medio de Proteosa en la oscuridad en ausencia de carbono fijo adicional no ocurrió o fue extremadamente mínimo.

Tabla 17. Especies de algas cultivadas sobre varias materias primas de alimentación de carbono fijo

Fuente de carbono fijo	Género/especie	Fuente /designación
Glucosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Glucosa	*Chlorella kessleri*	UTEX 397
Glucosa	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 2805
Glucosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Glucosa	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149
Glucosa	*Chlorella reisiglii*	CCAP 11/8
Glucosa	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Glucosa	*Prototheca stagnora*	UTEX 1442
Glucosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1434
Glucosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Glucosa	*Scenedesmus rubescens*	CCAP 232/1
Glicerol	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Glicerol	*Chlorella protothecoides*	CCAP 211/8d
Glicerol	*Bracteococcus medianucletus*	UTEX 1244
Glicerol	*Prototheca moriformis*	UTEX 288
Glicerol	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Glicerol	*Chlorella minutissima*	UTEX 2341
Glicerol	*Chlorella sp.*	CCAP 211/61
Glicerol	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1663
Xilosa	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2133
Xilosa	*Chlorella ellipsoidea*	SAG 2141
Xilosa	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149
Xilosa	*Chlorella sp.*	CCAP 211/75
Xilosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Xilosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Sacarosa	*Chlorella saccharophila*	UTEX 2469
Sacarosa	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Sacarosa	*Chlorella sp.*	UTEX EE102
Sacarosa	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2198
Sacarosa	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Sacarosa	*Chlorella minutissima*	CCALA 20024
Fructosa	*Chlorella kessleri*	UTEX 398
Fructosa	*Chlorella trebouxiodes*	SAG 3.95
Fructosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 27.87
Fructosa	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2214
Fructosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 31
Fructosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250

Fructosa	*Chlorella reisiglii*	CCAP 11/8
Fructosa	*Chlorella protothecoides*	CCAP 211/8d
Fructosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Fructosa	*Scenedesmus rubescens*	CCAP 232/1
Arabinosa	*Chlorella sp*	CCAP 211/75
Manosa	*Chlorella kessleri*	UTEX 263
Manosa	*Chlorella saccharophila*	UTEX 2911
Manosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Manosa	*Chlorella sp.*	SAG 241.80
Manosa	*Chlorella angustoellipsoidea*	SAG 265
Manosa	*Chlorella ellipsoidea*	SAG 2141
Manosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Manosa	*Chlorella emersonii*	CCAP 211/15
Manosa	*Bracteococcus minor*	UTEX 66
Manosa	*Prototheca stagnora*	UTEX 1442
Manosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1439
Manosa	*Chlorella cf. minutissima*	CCALA 20024
Manosa	*Scenedesmus rubescens*	CCAP 232/1
Galactosa	*Bracteococcus minor*	UTEX 66
Galactosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 14.82
Galactosa	*Parachlorella beijerinckii*	SAG 2046
Galactosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 25
Galactosa	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1602
Galactosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Galactosa	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149
Galactosa	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2214
Galactosa	*Chlorella ellipsoidea*	CCAP 211/42
Galactosa	*Chlorella ellipsoidea*	CCAP 211/50
Galactosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Galactosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 264
Galactosa	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Galactosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1439
Galactosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Galactosa	*Chlorella kessleri*	CCALA 252
Acetato	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1230
Acetato	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1810
Acetato	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Acetato	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80

Acetato	*Parachlorella kessleri*	SAG 27.87
Acetato	*Chlorella sp.*	SAG 241.80
Acetato	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2214
Acetato	*Chlorella protothecoides*	UTEX 31
Acetato	*Chlorella protothecoides*	UTEX 411
Acetato	*Chlorella ellipsoidea*	CCAP 211/42
Acetato	*Chlorella ovalis*	CCAP 211/21A
Acetato	*Chlorella protothecoides*	CCAP 211/8d
Acetato	*Prototheca stagnora*	UTEX 1442
Acetato	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Acetato	*Chlorella sorokiniana*	CCALA 260
Acetato	*Chlorella vulgaris*	CCAP 211/79
Acetato	*Paraclorella kessleri*	SAG 14.82

EJEMPLO 27

Producción de diesel renovable

Producción de células: se usó un lote de tanque F de *Chlorella protethecoides* (UTEX 250) (aproximadamente 1200 galones) se permite que el lote se ponga en operación (#ZA07126) por 100hrs, mientras se controlan los niveles de glucosa a 16 g/l después de lo cual se termina la alimentación de jarabe de maíz. Los niveles de glucosa residuales cayeron a <0 g/l dos horas después. Esto dio como resultado una edad final de 102hrs. El volumen final del caldo fue de 4542 L (1120 galones). Tanto verificaciones de contaminación en proceso como un análisis completo de una muestra final de caldo fallaron en demostrar algún signo de contaminación. El caldo de fermentación fue centrifugado y secado en tambor. Las células secadas en tambor fueron resuspendidas en hexano y homogenizadas a aproximadamente 1000bar. Luego se efectuó la

extracción de hexano usando métodos estándar y el aceite triglicérido de algas resultante fue determinado estar libre de hexano residual.

Producción de diesel renovable: el aceite de triglicérido de algas tenía un perfil de lípidos de aproximadamente (3% C18:0, 71% C18:1, 15% C18:2, 1% C18:3, 8% C16:0 y 2% de otros componentes. El aceite fue sometido primero a hidrocracking dando como resultado una pérdida de rendimiento de aproximadamente 20% a agua y gases. Luego se llevó a cabo la hidroisomerización con una pérdida aproximada de 10% en rendimiento a gases. Luego se efectúo una primera destilación para remover la fracción de naptha, dejando el producto deseado. Aproximadamente 20% del material se perdió a naptha en esta primera destilación. Luego se llevó a cabo una segunda destilación a una temperatura suficiente para remover fracciones necesarias para cumplir con la especificación D975 de ASTM pero dejando una fracción del fondo que no cumple con el punto de 90% para la destilación de D975. Aproximadamente 30% del material fue dejado en la fracción del fondo en la segunda destilación. El material resultante fue luego probado para todas las especificaciones de D975 de ASTM.

Las figuras 29 y 30 ilustran un cromatógrafo de gases y una grafica de distribución del punto de ebullición, respectivamente del producto de diesel renovable final producido mediante el método de la invención. La tabla 18

muestra la distribución del punto de ebullición del producto de diesel renovable resultante y la tabla 19 muestra los resultados de un análisis de producto final en cuanto a cumplimiento con las especificaciones D975 de ASTM.

Tabla 18. Distribución del punto de ebullición de producto de diesel renovable. PB = punto de ebullición

% masa recuperada	PB °C	% masa recuperada	PB °C	% masa recuperada	PB °C	% masa recuperada	PB °C
IBP	150.4	26.0	261.8	52.0	303.8	78.0	315.8
1.0	163.6	27.0	264.6	53.0	304.4	79.0	316.4
2.0	173.4	28.0	266.2	54.0	304.8	80.0	317.0
3.0	175.2	29.0	268.2	55.0	305.2	81.0	317.6
4.0	188.0	30.0	271.0	56.0	305.6	82.0	318.4
5.0	194.8	31.0	272.4	57.0	306.0	83.0	319.0
6.0	196.6	32.0	273.4	58.0	306.4	84.0	319.6
7.0	197.8	33.0	276.2	59.0	306.6	85.0	320.2
8.0	207.4	34.0	280.0	60.0	307.0	86.0	320.8
9.0	210.0	35.0	282.4	61.0	307.4	87.0	321.2
10.0	214.4	36.0	285.2	62.0	307.6	88.0	321.8
11.0	216.6	37.0	287.8	63.0	308.0	89.0	322.2
12.0	217.6	38.0	289.6	64.0	308.4	90.0	322.4
13.0	221.4	39.0	291.8	65.0	308.8	91.0	322.8
14.0	227.6	40.0	294.2	66.0	309.2	92.0	323.2
15.0	229.8	41.0	295.8	67.0	309.6	93.0	324.4
16.0	233.2	42.0	296.8	68.0	310.2	94.0	326.8
17.0	235.8	43.0	297.6	69.0	310.6	95.0	329.4
18.0	236.8	44.0	298.4	70.0	311.2	96.0	333.6
19.0	240.2	45.0	299.2	71.0	311.6	97.0	339.4
20.0	245.6	46.0	299.8	72.0	312.2	98.0	346.2
21.0	248.0	47.0	300.6	73.0	313.0	99.0	362.8
22.0	250.2	48.0	301.2	74.0	313.6	FBP	401.4
23.0	253.6	49.0	302.0	75.0	314.2		
24.0	255.2	50.0	302.6	76.0	314.8		
25.0	256.8	51.0	303.2	77.0	315.4		

Tabla 19. Reporte analítico para producto de diesel renovable utilizando especificaciones D975.

Método de número	Descripción de prueba	Resultados	Unidades
D93A	Punto de inflamación (PMCC)	70	°C
D2709	Agua y sedimentos	0	Vol %
D86	90% de destilación (recuperado)	301.0/573.9	°C/°F
D445	Viscosidad cinemática @ 40.0°C (104.0°F)	2.868	mm2/seg
D482	Azufre	<0.001	Peso %
D5453	Sulfuro	2.4	ppm
D130	Corrosión de cobre 3hrs @ 50°C	Lb	
D613	Número de cetano***	>65	
D976	Índice de cetano calculado	71.2	
D2500	Punto de turbidez	-3	°C
D524	Residuo de carbono de 10% de Ramsbotton	0.02	Peso%
D97	Punto de fluidez	-3	°C
D2274	Insolubles totales (estabilidad de oxidación) prueba de 40hrs ***	4.0	mg/100ml
D4052	Densidad @15.0°C (59.0°F)	793.8	Kg/mt3
D4176-1	Apariencia mediante inspección visual (lab)	Claro y brillante/ pasa	Visual
D4176-1	Apariencia mediante inspección visual (lab)	Libre de agua /pasa	Visual
D4176-1	Apariencia mediante inspección visual (lab)	Partículas /pasa	Visual
D1500	Color ASTM	L0.5	
D664	Número de ácido	<0.10	mg KOH/g
D6079	Lubricidad (marca de desgaste)	405	μm

SECUENCIAS

SEQ ID NO:1

Promotor HUP de Chlorella (subsecuencia de número de acceso GenBank X55349):

gatcagacgggcctgacctgcgagataatcaagtgctcgtaggcaaccaactcagcagctgcttggtgttgggtctgcaggatagtgtt
gcagggccccaaggacagcaggggaacttacaccttgtccccgacccagttttatggagtgcattgcctcaagagcctagccggagc
gctaggctacatacttgccgcaccggtatgaggggatatagtactcgcactgcgctgtctagtgagatgggcagtgctgcccataaac
aactggctgctcagccatttgttggcggaccattctgggggggccagcaatgcctgactttcgggtagggtgaaaactgaacaaagac
taccaaaacagaatttcttcctccttggaggtaagcgcaggccggcccgcctgcgcccacatggcgctccgaacacctccatagctgt
aagggcgcaaacatggccggactgttgtcagcactctttcatggccatacaaggtcatgtcgagattagtgctgagtaagacactatca
ccccatgttcgattgaagccgtgacttcatgccaacctgcccctgggcgtagcagacgtatgccatcatgaccactagccgacatgcg
ctgtcttttgccaccaaaacaactggtacaccgctcgaagtcgtgccgcacacctccgggagtgagtccggcgactcctccccggcg
ggccgcggccctacctgggtagggtcgccatacgcccacgaccaaacgacgcaggaggggattggggtagggaatcccaaccag
cctaaccaagacggcacctataataataggtgggggactaacagccctatatcgcaagctttgggtgcctatcttgagaagcacgag
ttggagtggctgtgtacggtcgaccctaaggtgggtgtgccgcagcctgaaacaaagcgtctagcagctgcttctataatgtgtcagcc
gttgtgtttcagttatattgtatgctattgtttgttcgtgctagggtggcgcaggcccacctactgtggcgggccattggttggtgcttgaatt
gcctcaccatctaaggtctgaacgctcactcaaacgcctttgtacaactgcagaactttccttggcgctgcaactacagtgtgcaaacca
gcacatagcactcccttacatcacccagcagtacaaca

SEQ ID NO:2

Promotor de Chlorella ellipsoidea nitrato reductasa de AY307383:

cgctgcgcaccagggccgccagctcgctgatgtcgctccaaatgcggtcccccgatttttgttcttcatcttctccaccttggtggccttc
ttggccagggccttcagctgcatgcgcacagaccgttgagctcctgatcagcatcctcaggaggccctttgacaagcaagcccctgtg
caagcccattcacggggtaccagtggtgctgaggtagatgggtttgaaaaggattgctcggtcgattgctgctcatggaattggcatgt
gcatgcatgttcacaatatgccaccaggctttggagcaagagagcatgaatgccttcaggcaggttgaaagttcctgggggtgaagag
gcagggccgaggattggaggaggaaagcatcaagtcgtcgctcatgctcatgttttcagtcagagtttgccaagctcacaggagcag
agacaagactggctgctcaggtgttgcatcgtgtgtgtggtgggggggggggggttaatacggtacgaaatgcacttggaattcccac
ctcatgccagcggacccacatgcttgaattcgaggcctgtggggtgagaaatgctcactctgccctcgttgctgaggtacttcaggccg
ctgagctcaaagtcgatgccctgctcgtctatcagggcctgcacctctgggctgaccggctcagcctccttcgcgggcatggagtagg
cgccggcagcgttcatgtccgggcccagggcagcggtggtgccataaatgtcggtgatggtggggaggggggccgtcgccacacc
attgccgttgctggctgacgcatgcacatgtggcctggctggcaccggcagcactggtctccagccagccagcaagtggctgttcag
gaaagcggccatgttgttggtccctgcgcatgtaattccccagatcaaaggagggaacagcttggatttgatgtagtgcccaaccgga
ctgaatgtgcgatggcaggtccctttgagtctcccgaattactagcagggcactgtgacctaacgcagcatgccaaccgcaaaaaaat
gattgacagaaaatgaagcggtgtgtcaatatttgctgtatttattcgttttaatcagcaaccaagttcgaaacgcaactatcgtggtgatca
agtgaacctcatcagacttacctcgttcggcaaggaaacggaggcaccaaattccaatttgatattatcgcttgccaagctagagctgat

ctttgggaaaccaactgccagacagtggactgtgatggagtgccccgagtggtggagcctcttcgattcggttagtcattactaacgtg
aaccctcagtgaagggaccatcagaccagaaagaccagatctcctcctcgacaccgagagagtgttgcggcagtaggacgacaag

SEQ ID NO:3

B. braunii malato deshidrogenasa 5'UTR:

aattggaaaccccgcgcaagaccgggttgtttggccgcctgaccggaaaggggggggcctgtcccgaaggggtctatctcttgggg
gatgtcgggcgcggaaagtcgatgttgatggacctcttcttcgaccatgtcggggtcgaggccaagagccgcgtccatttcgccgagt
tcatgatggaggtgaatgaccgcatcgccaccgaacgcgccaagaagcgggcgaccgatcgcccccgtcgctgcagcccttgccg
aggaagtccggctgctggcgttcgacgagatgatggtgacgaacagcccggacgcgatgatcctgtcgcggctgttcaccgcgctg
atcgaggcgggggtgacgatcgtcaccacctccaaccggccgcccagggatctctataagaacgggctcaaccgcgagcatttcct
gcccttcatcgcgctgatcgaggcgcggctggacgtgctggcgctgaacggcccgaccgactatcggcgcgaccggctggggcg
gctggacacgtggttggtgcccaatggccccaaggcgacgattaccttgtcggcggcgttcttccgcctgaccgactatccggtcgag
gatgccgcgcatgtgccctctgaggacctgaaggtgggcgggcgcgtgctgaatgtccccaaggcgctgaagggcgtcgcggtctt
ctcgttcaagcggttgtgcggcgaagcgcgggggggcggcggactatctggcggtcgcgcggggcttccacaccgtcatcctggtcg
gaatccccaagctgggggcggagaaccgcaacgaggcggggcgcttcgtccagctgatcgacgcgctctacgaacataaggtcaa
gctgctcgccgcagccgatgccagcccgccgaactctatgaaaccggcgacggccggttcgagtttgagcgcagatcagccggttg
gaagagatgcgctccgaggattatctggcccaaggccatggctcggaggggccttgatcaggccttaatgcacttcgcaaccattatc
gtttaaaatcttaaactctgtggaataacggttccccgacgccgcaatacacgtacgtccactacggagtaggattgga

SEQ ID NO:4

Promotor de Chlamydomonas RBCS2:

cgcttagaagatttcgataaggcgccagaaggagcgcagccaaaccaggatgatgtttgatggggtatttgagcacttgcaaccccttat
ccggaagccccctggcccacaaaggctaggcgccaatgcaagcagttcgcatgcagcccctggagcggtgccctcctgataaaacc
ggccaggggggcctatgttctttacttttttacaagagaagtcactcaacatcttaaacggtcttaagaagtctatccgg

SEQ ID NO:5

CMV-Hyg-CMV BamHI-SacII cassette de pCAMBIA:

ggatccccgggaattcggcgcgccgggcccaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctca
gaagaccaaagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatca
aaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgaca
gtggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgat
gtgataacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgagacttttc
aacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaaggtgg
cacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccaccc
acgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatg

acgcacaatcccactatccttcgcaagaccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctgaaatcaccagtctctct
ctacaaatctatctctctcgagctttcgcagatcccgggggggcaatgagatatgaaaaagcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaa
gtttctgatcgaaaagttcgacagcgtctccgacctgatgcagctctcggagggcgaagaatctcgtgctttcagcttcgatgtaggag
ggcgtggatatgtcctgcgggtaaatagctgcgccgatggtttctacaaagatcgttatgtttatcggcactttgcatcggccgcgctccc
gattccggaagtgcttgacattggggagtttagcgagagcctgacctattgcatctcccgccgtgcacagggtgtcacgttgcaagacc
tgcctgaaaccgaactgcccgctgttctacaaccggtcgcggaggctatggatgcgatcgctgcggccgatcttagccagacgagcg
ggttcggcccattcggaccgcaaggaatcggtcaatacactacatggcgtgatttcatatgcgcgattgctgatccccatgtgtatcact
ggcaaactgtgatggacgacaccgtcagtgcgtccgtcgcgcaggctctcgatgagctgatgctttgggccgaggactgccccgaa
gtccggcacctcgtgcacgcggatttcggctccaacaatgtcctgacggacaatggccgcataacagcggtcattgactggagcgag
gcgatgttcggggattcccaatacgaggtcgccaacatcttcttctggaggccgtggttggcttgtatggagcagcagacgcgctactt
cgagcggaggcatccggagcttgcaggatcgccacgactccgggcgtatatgctccgcattggtcttgaccaactctatcagagcttg
gttgacggcaatttcgatgatgcagcttgggcgcagggtcgatgcgacgcaatcgtccgatccggagccgggactgtcgggcgtaca
caaatcgcccgcagaagcgcggccgtctggaccgatggctgtgtagaagtactcgccgatagtggaaaccgacgccccagcactc
gtccgagggcaaagaaatagagtagatgccgaccggatctgtcgatcgacaagctcgagtttctccataataatgtgtgagtagttccc
agataagggaattagggttcctatagggtttcgctcatgtgttgagcatataagaaacccttagtatgtatttgtatttgtaaaatacttctatc
aataaaatttctaattcctaaaaccaaaatccagtactaaaatccagatcccccgaattaattcggcgttaattcagtacattaaaaacgtcc
gcaatgtgttattaagttgtctaagcgtcaatttgtttacaccacaatatatcctgccaccagccagccaacagctccccgaccggcagct
cggcacaaaatcaccactcgatacaggcagcccatcagtccgggacggcgtcagcgggagagccgttgtaaggcggcagactttg
ctcatgttaccgatgctattcggaagaacggcaactaagctgccgggtttgaaacacggatgatctcgcggagggtagcatgttgattg
taacgatgacagagcgttgctgcctgtgatcaccgcgg

SEQ ID NO:6

caaccacgtcttcaaagcaa

SEQ ID NO:7

agcaatcgcgcatatgaaat

SEQ ID NO:8

ATGCTTCTTCAGGCCTTTCTTTTTCTTCTTGCTGGTTTTGCTGCCAAGATCAGCGCC
TCTATGACGAACGAAACCTCGGATAGACCACTTGTGCACTTTACACCAAACAAG
GGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACGAAAAAGATGCCAAGTGG
CATCTGTACTTTCAATACAACCCGAACGATACTGTCTGGGGGACGCCATTGTTTT
GGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAATTGGGAGGACCAACCAATAGCTA
TCGCTCCGAAGAGGAACGACTCCGGAGCATTCTCGGGTTCCATGGTGGTTGACTA
CAACAATACTTCCGGCTTTTTCAACGATACCATTGACCCGAGACAACGCTGCGTG

GCCATATGGACTTACAACACACCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCGTATAGC
CTGGACGGTGGATACACTTTTACAGAGTATCAGAAGAACCCTGTGCTTGCTGCAA
ATTCGACTCAGTTCCGAGATCCGAAGGTCTTTTGGTACGAGCCCTCGCAGAAGTG
GATCATGACAGCGGCAAAGTCACAGGACTACAAGATCGAAATTTACTCGTCTGA
CGACCTTAAATCCTGGAAGCTCGAATCCGCGTTCGCAAACGAGGGCTTTCTCGGC
TACCAATACGAATGCCCAGGCCTGATAGAGGTCCCAACAGAGCAAGATCCCAGC
AAGTCCTACTGGGTGATGTTTATTTCCATTAATCCAGGAGCACCGGCAGGAGGTT
CTTTTAATCAGTACTTCGTCGGAAGCTTTAACGGAACTCATTTCGAGGCATTTGAT
AACCAATCAAGAGTAGTTGATTTTGGAAAGGACTACTATGCCCTGCAGACTTTCT
TCAATACTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGCATTGCGTGGGCTTCTAACTG
GGAGTATTCCGCATTCGTTCCTACAAACCCTTGGAGGTCCTCCATGTCGCTCGTG
AGGAAATTCTCTCTCAACACTGAGTACCAGGCCAACCCGGAAACCGAACTCATA
AACCTGAAAGCCGAACCGATCCTGAACATTAGCAACGCTGGCCCCTGGAGCCGG
TTTGCAACCAACACCACGTTGACGAAAGCCAACAGCTACAACGTCGATCTTTCGA
ATAGCACCGGTACACTTGAATTTGAACTGGTGTATGCCGTCAATACCACCCAAAC
GATCTCGAAGTCGGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTTAAAGGCCTGGAAGAC
CCCGAGGAGTACCTCAGAATGGGTTTCGAGGTTTCTGCGTCCTCCTTCTTCCTTGA
TCGCGGGAACAGCAAAGTAAAATTTGTTAAGGAGAACCCATATTTTACCAACAG
GATGAGCGTTAACAACCAACCATTCAAGAGCGAAAACGACCTGTCGTACTACAA
AGTGTATGGTTTGCTTGATCAAAATATCCTGGAACTCTACTTCAACGATGGTGAT
GTCGTGTCCACCAACACATACTTCATGACAACCGGGAACGCACTGGGCTCCGTGA
ACATGACGACGGGTGTGGATAACCTGTTCTACATCGACAAATTCCAGGTGAGGG
AAGTCAAGTGA

SEQ ID NO:9

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

SEQ ID NO:10

TTGTCGGAATGTCATATCAA

SEQ ID NO:11

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

SEQ ID NO:12

AACGCCTTTGTACAACTGCA

SEQ ID NO:13

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

SEQ ID NO:14

MTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEKDAKWHLYFQYNPNDTVWGTPLF
WGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFSGSMVVDYNNTSGFFNDTIDPRQRCVAI
WTYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFWYEPSQKWIMT
AAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPGLIEVPTEQDPSKSYWVM
FISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYYALQTFFNTDPTYGS
ALGIAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILNISN
AGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFK
GLEDPEEYLRMGFEVSASSFFLDRGNSKVKFVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSY
YKVYGLLDQNILELYFNDGDVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVR
EVK

SEQ ID NO:15

MLLQAFLFLLAGFAAKISAS

SEQ ID NO:16

MANKSLLLLLLLGSLASG

SEQ ID NO:17

MARLPLAALG

SEQ ID NO:18

MANKLLLLLLLLLLPLAASG

SEQ ID NO:19

MLLQAFLFLLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEKDAKWHLYF
QYNPNDTVWGTPLFWGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFSGSMVVDYNNTSGFFND
TIDPRQRCVAIWTYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFWYEPSQ
KWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPGLIEVPTEQDPSKSYWV
MFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYYALQTFFNTDPTYGSALG
IAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILNISNAGPWSRF
ATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFKGLEDPEEYLRMG

FEVSASSFFLDRGNSKVKFVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYYKVYGLLDQNILELYFN
DGDVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVREVK

SEQ ID NO:20

CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGC

SEQ ID NO:21

CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG

SEQ ID NO:22

GTGGCCATATGGACTTACAA

SEQ ID NO:23

CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG

SEQ ID NO:24

CACCCGTCGTCATGTTCACGGAGCCCAGTGCG

SEQ ID NO:25

gaattccccaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgaga
cttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaag
gtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccc
acccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgaacatggtggagcacgac
actctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaac
ctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgat
aaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaaga
agacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgca
agaccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctgaaatcaccagtctctctctacaaatctatctctggcgcgcc
atatcaATGCTTCTTCAGGCCTTTCTTTTTCTTCTTGCTGGTTTTGCTGCCAAGATCAG
CGCCTCTATGACGAACGAAACCTCGGATAGACCACTTGTGCACTTTACACCAAAC
AAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACGAAAAAGATGCCAAG
TGGCATCTGTACTTTCAATACAACCCGAACGATACTGTCTGGGGGACGCCATTGT
TTTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAATTGGGAGGACCAACCAATAG
CTATCGCTCCGAAGAGGAACGACTCCGGAGCATTCTCGGGTTCCATGGTGGTTGA
CTACAACAATACTTCCGGCTTTTTCAACGATACCATTGACCCGAGACAACGCTGC
GTGGCCATATGGACTTACAACACACCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCGTAT
AGCCTGGACGGTGGATACACTTTTACAGAGTATCAGAAGAACCCTGTGCTTGCTG
CAAATTCGACTCAGTTCCGAGATCCGAAGGTCTTTTGGTACGAGCCCTCGCAGAA
GTGGATCATGACAGCGGCAAAGTCACAGGACTACAAGATCGAAATTTACTCGTC

TGACGACCTTAAATCCTGGAAGCTCGAATCCGCGTTCGCAAACGAGGGCTTTCTC
GGCTACCAATACGAATGCCCAGGCCTGATAGAGGTCCCAACAGAGCAAGATCCC
AGCAAGTCCTACTGGGTGATGTTTATTTCCATTAATCCAGGAGCACCGGCAGGAG
GTTCTTTTAATCAGTACTTCGTCGGAAGCTTTAACGGAACTCATTTCGAGGCATTT
GATAACCAATCAAGAGTAGTTGATTTTGGAAAGGACTACTATGCCCTGCAGACTT
TCTTCAATACTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGCATTGCGTGGGCTTCTAA
CTGGGAGTATTCCGCATTCGTTCCTACAAACCCTTGGAGGTCCTCCATGTCGCTC
GTGAGGAAATTCTCTCTCAACACTGAGTACCAGGCCAACCCGGAAACCGAACTC
ATAAACCTGAAAGCCGAACCGATCCTGAACATTAGCAACGCTGGCCCCTGGAGC
CGGTTTGCAACCAACACCACGTTGACGAAAGCCAACAGCTACAACGTCGATCTTT
CGAATAGCACCGGTACACTTGAATTTGAACTGGTGTATGCCGTCAATACCACCCA
AACGATCTCGAAGTCGGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTTAAAGGCCTGGAA
GACCCCGAGGAGTACCTCAGAATGGGTTTCGAGGTTTCTGCGTCCTCCTTCTTCCT
TGATCGCGGGAACAGCAAAGTAAAATTTGTTAAGGAGAACCCATATTTTACCAA
CAGGATGAGCGTTAACAACCAACCATTCAAGAGCGAAAACGACCTGTCGTACTA
CAAAGTGTATGGTTTGCTTGATCAAAATATCCTGGAACTCTACTTCAACGATGGT
GATGTCGTGTCCACCAACACATACTTCATGACAACCGGGAACGCACTGGGCTCCG
TGAACATGACGACGGGTGTGGATAACCTGTTCTACATCGACAAATTCCAGGTGA
GGGAAGTCAAGTGAgatctgtcgatcgacaagctcgagtttctccataataatgtgtgagtagttcccagataagggaatta
gggttcctatagggtttcgctcatgtgttgagcatataagaaacccttagtatgtatttgtatttgtaaaatacttctatcaataaaatttctaatt
cctaaaaccaaaatccagtactaaaatccagatcccccgaattaa

REIVINDICACIONES SOLICITUD
DIVISIONAL No. 09.149.183

1. Un método para producir un lípido, que comprende:

(a) Cultivar una población de microalgas bajo condiciones heterotróficas en un medio de cultivo que comprende material celulósico despolimerizado como una fuente de carbón primario hasta que las microalgas acumulen 60% o más de su peso de células secas como lípido; y

(b) Separar el lípido de las microalgas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el material celulósico despolimerizado comprende xilosa.

3. El método de la reivindicación 2, en donde las microalgas están caracterizadas por un nivel mayor de producción de lípidos en la etapa de cultivar que cuando se cultivan en solo glucosa.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el material celulósico despolimerizado comprende glucosa y xilosa.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo es agénico.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el material celulósico despolimerizado es uno o más materiales seleccionados del grupo que consiste de bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, rastrojo de maíz, paja de

trigo, paja de arroz, pulpa de remolacha de azúcar, pulpa de cítricos, cáscaras de cítricos, clareos de madera, clareos de coníferas, virutas de madera, aserrín, desechos de molienda de pulpa, desechos de papel urbano, recortes de césped, pasto varilla, madera de álamo híbrido, miscanto, fibra de caña, y fibra de sorgo.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el material celulósico despolimerizado es bagazo de caña.

8. El método de la reivindicación 6, en donde el material celulósico despolimerizado es fibra de maíz.

9. El método de la reivindicación 6, en donde el material celulósico despolimerizado es miscanto.

10. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas son cultivadas bajo condiciones limitadas de nitrógeno.

11. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido comprende 50% o más de C18:1.

12. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido comprende 3% o más de C18:0 y 8% o más de C16:0.

13. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas acumulan 65% o más de su peso de células secas como lípido.

14. El método de la reivindicación 13, en donde las microalgas acumulan 70% o más de su peso de células secas como lípido.

15. El método de la reivindicación 1, en donde separar el lípido de las microalgas comprende lisar las microalgas y recuperar el lípido usando un solvente orgánico.

16. El método de la reivindicación 15, en donde el solvente orgánico es hexano.

17. El método de la reivindicación 1, que comprende además tratar el material celulósico con una enzima produciendo así el material celulósico despolimerizado del medio de cultivo.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde las microalgas se seleccionan del grupo que consiste de *Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Bracteococcus minor, Bracteococcus medionucleatus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora (cepa SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis,*

Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella ovalis, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (incluyendo cualquiera de las cepas UTEX 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta, Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEX LB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp.,

Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, Parachlorella kessleri, Pascheria acidophila, Pavlova sp., Phagus, Phormidium, Platymonas sp., Pleurochrysis carterae, Pleurochrysis dentate, Pleurochrysis sp., Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis, Prototheca zopfii, Pseudochlorella aquatica, Pyramimonas sp., Pyrobotrys, Rhodococcus opacus, Sarcinoid chrysophyte, Scenedesmus armatus, Schizochytrium, Spirogyra, Spirulina platensis, Stichococcus sp., Synechococcus sp., Tetraedron, Tetraselmis sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii, y *Viridiella fridericiana*.

19. El método de la reivindicación 18, en donde las microalgas son del gen *Chlorella* o *Prototheca*.

20. El método de la reivindicación 19, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides.*

21. El método de la reivindicación 19, en donde las microalgas son *prototheca moriformis.*

22. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de cultivar se lleva a cabo en la ausencia de luz.

23. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas son heterótrofas obligadas.

24. Un lípido producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona métodos y composiciones útiles para la producción de aceites, combustibles, oleoquímicos y otros compuestos en microorganismos. En particular, la invención proporciona microorganismos portadores de aceite y métodos de cultivo a bajo costo de tales microorganismos. La invención también proporciona células microbianas que contienen genes exógenos que codifican, por ejemplo una lipasa, transportador de sacarosa, sacarosa invertasa, fructocinasa, una enzima polisacárido-degradante, acil-ACP tioesterasa grasa, acil-CoA/aldehído reductasa grasa, acil-CoA reductasa grasa, aldehído reductasa grasa, aldehído descarbonilasa grasa y/o una proteína portadora de acilo. La invención también incluye métodos para la manufactura de combustible de transportación tales como diesel renovable, biodiesel y combustible de jet renovable.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Jeffrey W. Bullock*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

5. *at Dover, Delaware*

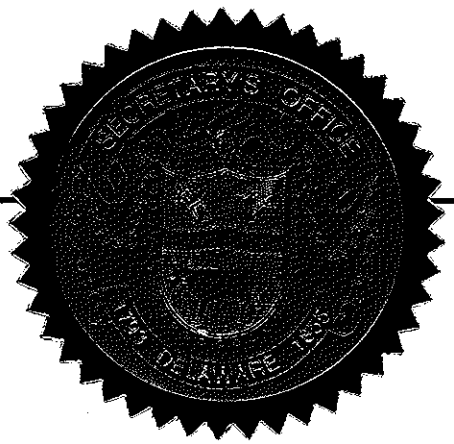
6. *the twenty-fifth day of March, A.D. 2010*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0410473*

9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature:*



Secretary of State

Delaware

The First State

I, JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "SOLAZYME, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE EIGHTEENTH DAY OF MARCH, A.D. 2010.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "SOLAZYME, INC." WAS INCORPORATED ON THE THIRTY-FIRST DAY OF MARCH, A.D. 2003.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.



Jeffrey W. Bullock, Secretary of State

3635550 8300

AUTHENTICATION: 7879430

100295413

DATE: 03-18-10

You may verify this certificate online at corp.delaware.gov/authver.shtml

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by M.K. Carter

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the fifth of February, 2010

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 10013788-10

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Patrick O. Hatchett

A 1785500

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

January 25, 2010

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON JANUARY 13, 2010.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

M. K. CARTER
Certifying Officer

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
DEPARTMENT OF COMMERCE

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

01/13/2010
501064014

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Harrison F. Dillon	06/27/2008
Anthony G. Day	06/30/2008
Donald E. Trimbur	07/03/2008
Chung-Soon Im	06/30/2008
Anna Coragliotti	07/01/2008
Scott Franklin	06/30/2008

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Solazyme, Inc.
Street Address:	561 Eccles Avenue
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
PCT Number:	US0865563

US0865563
CH $40.00

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (415)576-0300
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650-326-2400
Email: mrcatiis@townsend.com
Correspondent Name: Lance Termes
Address Line 1: TOWNSEND and TOWNSEND and CREW LLP
Address Line 2: Two Embarcadero Center, 8th Floor
Address Line 4: San Francisco, CALIFORNIA 94111-3834

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	026172-002430PC

NAME OF SUBMITTER:	Lance Termes

Total Attachments: 2
source=Solazyme#page1.tif
source=Solazyme#page2.tif

Attorney Docket No.: 026172-002430PC

ASSIGNMENT OF PATENT APPLICATION

JOINT

WHEREAS, Harrison F. Dillon of South San Francisco, CA 94080; Anthony G. Day of South San Francisco, CA 94080; Donald E. Trimbur of South San Francisco, CA 94080; Chung-Soon Im of South San Francisco, CA 94080, Anna Coragliotti of South San Francisco, CA 94080, and Scott Franklin of South San Francisco, CA 94080, hereinafter referred to as "ASSIGNORS," are the inventors of the invention described and set forth in the below-identified application:

Title of Invention: PRODUCTION OF OIL IN MICROORGANISMS

Filing Date: June 02, 2008

Application No.: PCT/US08/65563

WHEREAS, Solazyme, Inc., a Delaware corporation, located at 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080, hereinafter referred to as "ASSIGNEE," is desirous of acquiring ASSIGNORS' interest in the invention and application and in any Patent and/or Registration which may be granted on the same;

NOW THEREFORE, for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged by ASSIGNORS, ASSIGNORS have assigned, and by these presents do assign to ASSIGNEE and ASSIGNEE'S successors and assigns, all their right, title and interest in and to the invention and application, and in and to any Patent and/or Registration which may hereafter be granted on or claiming priority from the same in the United States or other country in the world, the right, title and interest to be held and enjoyed by ASSIGNEE and ASSIGNEE'S successors and assigns as fully and exclusively as it would have been held and enjoyed by ASSIGNORS had this Assignment not been made, for the full term of any Letters Patent and Registrations which may be granted thereon, or of any division, renewal, continuation in whole or in part, substitution, conversion, reissue, prolongation or extension thereof.

ASSIGNORS further agree that they will, without charge to ASSIGNEE, but at ASSIGNEE'S expense, (a) cooperate with ASSIGNEE in the prosecution of the application and/or any applications on the invention, including foreign counterparts, (b) execute, verify, acknowledge and deliver all such further papers, including patent applications and instruments of transfer, and (c) perform such other acts as ASSIGNEE lawfully may request to obtain or maintain Letters Patent and/or Registrations for the invention and improvements in any and all countries, and to vest title thereto in ASSIGNEE, or ASSIGNEE'S successors and assigns.

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignors have signed their names on the dates indicated.

Dated: 6/27/08 — Harrison F. Dillon

Dated: 6/30/08 — Anthony G. Day

Dated: 7/3/08 — Donald E. Trimbur

Dated: 6/30/08 — Chung-Soon Im

Dated: 7/1/08 — Anna Coragliotti

Dated: 6/30/08 — Scott Franklin

BAKER & McKENZIE

Baker & McKenzie Colombia S.A.
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 900.034.906-9
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakernet.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

Solazyme, Inc.

located at

561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080

declares that it hereby grants to

ÁLVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
RICARDO METKE MENDEZ and/or
JUAN PABLO CONCHA-DELGADO and/or
OLGA GEORGETTE OTERO

of the firm Baker & McKenzie Colombia S.A. members of Baker & McKenzie, domiciled at Av. 82 No. 10-62, 6th floor, of Bogotá D.C., Colombia, full and sufficient power of attorney to pursue before the competent authorities the following matters:

Trademark registrations and renewals; deposit and registration of commercial names and commercial ensigns; registration and renewal of domain names; obtainment of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits layout-designs and vegetal varieties; recordals of mergers, changes of name, assignments, changes of domicile and address; security interests; recordal of license of use agreements, liens and other acts that affect or limit the mentioned industrial property rights; filing and prosecution of all matters relating to domain names; filing and prosecution of oppositions, cancellation actions, annulment actions, annulment and reinstatement of right action, precautionary injunctions, infringement actions, and all administrative and judicial actions available for the prosecution of proceedings related to industrial property matters, unfair competition and protection of consumers,

to which end it empowers them to file requests, petitions and lawsuits, appeals and objections, pay taxes, receive, including faculties to enter into settlement agreements, conciliations and transactions, abandon applications and renounce to intellectual property rights and, in general, to take all the actions before the competent authorities in order to duly protect our intellectual property. To the said mandatories sufficient power is granted hereby to receive notifications for and on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the Company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the intellectual property rights, and to do everything that may be required before administrative or judicial officers of any class to comply this power, giving them likewise faculty to substitute these presents and revoke such substitutions if necessary.

Done and subscribed in South San Francisco, California

On the 1st day of Feb. of 20 10

Signature of the person Issuing the Power

PODER

La abajo firmada,

Solazyme, Inc.

domiciliada en

561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080

declara por el presente que otorga a

ÁLVARO CORREA-ORDÓÑEZ y/o
RICARDO METKE MÉNDEZ y/o
JUAN PABLO CONCHA-DELGADO y/o
OLGA GEORGETTE OTERO

de la firma Baker & McKenzie Colombia S.A. miembros de Baker & McKenzie, domiciliada en la Av. 82 No. 10-62 Piso 6 en Bogotá D.C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para adelantar ante las autoridades competentes los siguientes asuntos:

Registro y renovación de marcas; depósito y registro de nombres comerciales y enseñas comerciales; registro y renovación de nombres de dominio; obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; inscripción de fusiones, cambios de nombre, traspasos, cambios de domicilio y de dirección; inscripción de contratos de prenda, inscripción de licencias de uso, embargos y otros actos que afecten o limiten los mencionados derechos de propiedad industrial; presentación y tramitación de todos los asuntos relacionados con nombres de dominio; presentación y tramitación de oposiciones, acciones de cancelación, acciones de nulidad, acciones de nulidad y restablecimiento del derecho, medidas cautelares, acciones por infracción de derechos, y demás acciones judiciales, relacionadas con procesos de propiedad industrial, competencia desleal y protección del consumidor,

A cuyo efecto los faculta para presentar solicitudes, peticiones y demandas, interponer recursos, reclamos, pagar impuestos y tasas, recibir, transigir y desistir, incluyendo facultades para entrar en acuerdos amigables, conciliaciones y transacciones, abandonar solicitudes y renunciar a derechos de propiedad industrial, y en general, a dar ante las autoridades competentes todos los pasos necesarios para la debida protección de nuestra propiedad industrial. Asimismo se concede a los expresados mandatarios poder suficiente para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de los derechos de propiedad industrial se presentaren y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden para el cumplimiento de este mandato, dándoles igualmente facultad para sustituir el presente poder y en caso necesario, revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado en South San Francisco, California

A los 1st días del mes de Feb. de 20 10

Firma de la persona que firma el Poder

EXECUTION IN THE PRESENCE OF A NOTARY IS REQUIRED

State of California

SECRETARY OF STATE

Requested for use in Colombia.
Not for use within the United States of America.
The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document has acted, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by L. S. Mcintosh*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of L. S. Mcintosh, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 8th day of February 2010*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 778920*
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature*

Debra Bowen
Secretary of State



BY _____

ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo)

On February 1, 2010 before me, L.S. McIntosh
(insert name and title of the officer)

personally appeared Harrison Dillon,
who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

L. S. MCINTOSH
COMM. # 1867263
NOTARY PUBLIC-CALIFORNIA
ALAMEDA COUNTY
MY COMM. EXP. JULY 24, 2012

Signature _____ (Seal)

Traducción oficial de inglés por Marlén Neira C. resolución 2117 de Ministerio Justicia de Colombia

APOSTILLA EN CESIÓN A SOLAZYME, INC.

APOSTILLE

(Convención de La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por M.K. Carter
3. Quien ejerce funciones de oficial de certificación
4. Lleva el sello de Oficina de marcas y patentes U.S.

CERTIFICADO

5. En Washington, D.C.
6. El 5 de febrero de 2010.
7. Por el oficial de autenticación asistente, departamento de estado de los Estados Unidos
8. No. 10013788-10
9. Gran Sello del estado
10. Firma ilegible del Patrick O.. Hatchett

Estados Unidos de América. –

A todos a quienes vieren el presente,

Departamento de Comercio de Los Estados Unidos

Oficina de marcas registradas y patentes de los Estados Unidos

25 de enero de 2010

Por el presente certifico que anexo se encuentra una copia verdadera de los registros de esta oficina de un documento registrado el 13 de enero de 2010.

Por autoridad de Sub-secretario de Comercio para la Propiedad intelectual

Y Director de la Oficina de marcas registradas y patentes de los Estados Unidos.

Firma y nombre de M. K. Carter oficial certificador

A mano:

Departamento de comercio- Estados Unidos Oficina de marcas y patentes

CESION DE PATENTE

Versión electrónica v1.1 01/ 13/ 2010.

Versión Stylesheet v1.1 501064014

Tipo de presentación	Cesión nueva
Naturaleza de la cesión	Traspaso

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

Datos de la parte cedente

Nombre	Fecha de suscripción 3/3
Harrison F. Milton	06 / 27/ 2008
Anthony G. Day	08 / 30 /2008
Donald E. Trimbur	07 / 03/ 2008
Chung- Soon Im	06 / 30 / 2008
Anna Coraglioti	07 / 01 / 2008
Scott Franklin	06 / 30 / 2008

DATOS DE LA PARTE RECEPTORA	
Nombre	Solazyme, Inc.
Dirección	561 Eccles Avenue
Ciudad	South San Francisco
Estado/ país	California
Código postal	94080

Números de propiedad Total: 1	
Tipo propiedad	Número
Número PCT	US0865563

DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Fax	415- 576-0300
Se enviará correspondencia por el correo US cuando el intento de enviar fax fracaso	
Teléfono	650-326- 2400
Dirección electrónica	mrcatiis@townsend.com
Nombre de correspondencia	Lance Termes
Línea 1 de dirección	Townsend and Townsend and Crew LLP
Línea 2 de dirección	Two Embarcadero Center, 8th Floor
Línea 4 de dirección	San Francisco, California 94111-3834
Número de casillero abogado	026172- 002430PC
Nombre del solicitante	Lance Termes

No. Anexos: 2	Rollo: 023772 Marco: 0307
Fuente- Solazyme# pagina1.rtf	
Fuente- Solazyme# pagina2.rtf	Rollo: 023772 Marco: 0308

Casilla de abogado NO. 026172-002430PC

CESION DE SOLICITUD DE PATENTES Conjunta

Por cuanto, Harrison F. Dillon de South San Francisco CA 94080; Anthony G. Day de South San Francisco, CA 94080; Donald E. Trimbur de South San Francisco, CA, 94080; Chung-Soon Im de South San Francisco, CA 94080, Anna Coragliotti de South San Franciso, CA 94080, y Scott Franklin de South San Francisco, CA 94080m en adelante referidos como

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

"Cedentes" son los inventores de la invención descrita y establecida en la solicitud identificada a continuación: 3/3

Título de la invención: PRODUCCION DE ACEITE EN MICROORGANISMOS

Fecha de presentación: 2 de junio de 2008

Solicitud No. PCT/ US08 / 65563

Por cuanto, Solazyme, Inc, una compañía de Delaware, localizada en el 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080, en adelante referida como la "Cesionaria", tiene la intención de adquirir el interés de los Cedentes en la invención y en la solicitud de patente y/o registro que pueda otorgarse a la misma;

Por lo tanto, por una contraprestación buena y valiosa, cuyo recibo se reconoce por el presente, los Cesionarios han cedido, y por el presente ceden a la Cesionaria y a los sucesores y cesionarios de la Cesionaria, todos sus derechos, títulos e interés en y sobre la invención y solicitud, y en la patente y/ o registro que pueda otorgarse en adelante o sobre la que pueda reclamarse prioridad de la misma en los Estados Unidos o en otro país del mundo; tal derecho, título e interés lo tendrá y disfrutará la Cesionaria y los sucesores y cesionarios de la Cesionaria tan total y exclusivamente como si lo tuvieran y disfrutaran los Cedentes si no se hubiera hecho tal cesión, por todo el término de la Patente y Registro que puedan otorgarse a la misma, o una división, renovación, continuación total o parcial, sustitución, conversión, re-expedición, prolongación o extensión de la misma invención.

Los Cedentes acuerdan además que, sin cargo para la Cesionaria, sino a expensas de la Cesionaria, ellos (a) cooperarán con la Cesionario en la persecución de la solicitud, y/ o de alguna solicitud de la invención, incluyendo contrapartes extranjeras, (b) suscribiendo, verificando, reconociendo y entregando todos los demás papeles, que incluyen solicitudes de patentes e instrumentos de transferencia, y (c) realizando cualquier otro acto que la Cesionaria solicite legalmente para obtener o mantener Patentes y/ o Registros para la invención y mejoras en todos y cada uno de los países, y para investir el título de ella en la Cesionaria, o en los sucesores y cesionarios de al Cesionaria.

Rollo: 023772 Marco: 0309

Cesión
Casillero de abogado No. 026172- 002430PC
Solicitudes PCT NO. PCT/ US 08 / 65563
Página 2

En testimonio de lo anterior, hemos firmado en las fechas indicadas a continuación.

Fechado : 6- 27- 08	Harrison F. Dillon
Fechado el 6- 30- 08	Anthony G. Day
Fechado el: 7- 3- 08	Donald E. Trimbur
Fechado el 6- 30- 08	Chung Soon Im
Fechado :el 7- 1- 08	Anna Coragliotti
Fechado el 6- 30- 08	Scott Franklin

Registrado el 01 / 03 / 2010 Rollo: 023772 Marco: 0301

Es traducción conforme con copia en archivo de traductora, Bogotá, Febrero 24- 2010.

Helu Neira C

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

Métodos y composiciones para la producción de aceites combustibles y oleoquímicos fabricados a partir de microorganismos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente revelación es concerniente con la producción de aceites, combustibles y oleoquímicos fabricados a partir de microorganismos. En particular, la revelación es concerniente con microorganismos portadores de aceite, en los que se incluyen microalgas, levaduras y hongos y con métodos para cultivar tales microorganismos para la producción de compuestos útiles, en los que se incluyen lípidos, ésteres de ácido graso, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos, para uso en la industria o como una fuente de energía o alimento.

Los microorganismos de la invención pueden ser seleccionados o diseñados genéticamente para uso en los métodos u otros aspectos de la invención descrita en la presente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El combustible fósil es un término general para depósitos geológicos combustibles enterrados de materiales orgánicos formados a partir de plantas y animales en decaimiento que han sido convertidos a aceptable crudo, carbón, gas natural o aceites pesados mediante exposición a calor y

presión en la corteza terrestre durante cientos de millones de años.

En el diálogo común, el combustible fósil, también conocido como combustible mineral, es usado como sinónimo con otros recursos naturales que contienen hidrocarburos tales como carbón, aceite y gas natural. La utilización de combustibles fósiles ha habilitado el desarrollo industrial a gran escala y suplantado extensamente los molinos impulsados por agua, también como la combustión de madera o ++++ torba para calentamiento. Los combustibles fósiles son un recurso no renovable finito.

Cuando se genera electricidad, la energía de la combustión de combustibles fósiles es frecuentemente usada para impulsar una turbina. Las generaciones más antiguas frecuentemente usaban vapor generado por el quemado de combustible para hacer girar la turbina, pero en las plantas de energía más nuevas, los gases producidos por el quemado del combustible hace girar una turbina de gas directamente. Con la modernización global en los siglos veinte y veintiuno, la sed de energía de combustibles fósiles, especialmente gasolina derivada de petróleo, es una de las causas de conflictos regionales y globales mayores.

El quemado de los combustibles fósiles por humanos es la fuente más grande de emisiones de dióxido de carbono, que es uno de los gases de invernadero que permiten el forzado

radioactivo y contribuyen al calentamiento global. En los Estados Unidos de América, más del 90% de las emisiones de gas de invernadero vienen de la combustión de combustibles fósiles. Además, otros contaminantes de aire, tales como óxido de nitrógeno, dióxido de azufre, compuestos orgánicos volátiles (VOC) y metales pesados son producidos.

La actividad humana eleva los niveles de gases de invernadero principalmente por la liberación de dióxido de carbono de la combustión del combustible fósil, pero otros gases, por ejemplo metano no son despreciables. Las concentraciones de varios gases de invernadero se ha incrementado con el paso del tiempo debido a actividades humanas tales como el quemado de combustibles fósiles y deforestación conduciendo a concentraciones más altas de dióxido de carbono. De acuerdo con la hipótesis de calentamiento global, los gases de invernadero de la industria y agricultura han jugado un papel principal en el calentamiento global observado recientemente.

La demanda incrementada por energía por la economía global también ha colocado presión incrementada sobre el costo de los hidrocarburos. Además de la energía, muchas industrias, en los que se incluyen fabricantes de plásticos y químicos, dependen fuertemente de la disponibilidad de hidrocarburos como materia prima para sus procesos de manufactura. Alternativas efectivas en el costo a las fuentes actuales de suministro

podrían ayudar a mitigar la presión ascendente sobre la energía y estos costos de materias primas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la presente invención proporciona un microbio, que en varias modalidades puede comprender una célula de microalgas, una levadura oleaginosa o un hongo que contiene un gen exógeno que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste de una lipasa, transportador de sacarosa, sacarosa invertasa, fructocinasa, enzima degradante de polisacárido, una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA aldehído reductasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa, un aldehído decarbonilasa grasa y una proteína portadora de acilo (ACP). El microbio (por ejemplo, célula de microalga) puede ser seleccionado por ejemplo de la Tabla 1. En modalidades particulares, la célula es una especie del género *Chlorella*, tal como por ejemplo *Chlorella fusca*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella ellipsoidea*. En otras modalidades, el microbio es una levadura oleaginosa seleccionada del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus terricolus*, *Candida sp.*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer*, *Endomycopsis vernalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, y *Yarrowia lipolytica*. En todavía otras modalidades,

el microbio es un hongo seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella*, *Mortierrla vinacea*, *Mortierella alpine*, *Pythium debaryanum*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Pennicillium iilacinum*, una especie del género *Hensenulo*, una especie del género *Chaetomium*, una especie del género *Cladosporium*, una especie del género *Malbranchea*, una especie del género *Rhizopus*, y una especie del género *Pythium*. En otras modalidades, la invención incluye la expresión de enzimas de modificación de hidrocarburos en huéspedes bacterianos tales como *E. coli* y *Bacilla* método para producir diesel renovable. En una modalidad, el método comprende: (a) cultivar una población de microorganismos en presencia de una fuente de carbono fija, en donde (i) los microorganismos acumulan por lo menos 10% de su peso celular seco como lípido y (ii) la fuente de carbono fija es seleccionada del grupo que consiste de glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarosa, melasas, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, fructosa, arabinosa, manosa, acetato y cualquier combinación de los anteriores, (b) aislar los componentes de lípido de los microorganismos cultivados y (c) someter los componentes de lípidos aislados a una o más reacciones químicas para generar alcanos de cadena recta, mediante lo cual se produce el diesel renovable.

En otro aspecto, la presente invención es

concerniente con una composición de hidrocarburos líquidos fabricados de acuerdo con el método descrito directamente anterior, en donde la composición se conforma a las especificaciones de ASTM D975.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para producir combustible de jet. En una modalidad, el método comprende (a) cultivar una población de microorganismos en presencia de una fuente de carbono fija, en donde (i) los microorganismos acumulan por lo menos 10% de su peso de célula seco como lípido y (ii) la fuente de carbono fija es seleccionada del grupo que consiste de glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarosa, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, fructosa, arabinosa, manosa, acetato y cualquier combinación de los anteriores, (b) aislar los componentes de lípido de los microorganismos cultivados, (c) someter a los componentes de lípidos aislados a una o más reacciones químicas para generar alcanos de cadena recta, (d) someter a pirólisis catalítica o cracking los alcanos de cadena recta, mediante lo cual se produce el combustible de jet.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una composición de hidrocarburos líquidos producidos de acuerdo con el método descrito directamente anterior, en donde la composición se conforma a las especificaciones de ASTM D 1655.

En otro aspecto, la presente invención es

concerniente con una microalga o célula de levadura que ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de ruta de lípido a un nivel alterado en comparación con una célula tipo silvestre de la misma especie. En algunos casos, la célula produce más lípido en comparación con la célula tipo silvestre cuando ambas células son cultivadas bajo las mismas condiciones. En algunos casos, la célula ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de ruta de lípido a un nivel más alto que la célula tipo silvestre. En algunos casos, la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de piruvato deshidrogenasa, acetilo-CoA carboxilasa, proteína portadora de acilo y glicerol-3 fosfato aciltransferasa. En algunos casos, la célula ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de ruta de lípido a un nivel más bajo que la célula tipo silvestre. En por lo menos una modalidad en la cual la célula expresa la enzima de ruta de lípido a un nivel más bajo, la enzima de ruta de lípido comprende citrato sintasa.

En algunas modalidades, la microalga o célula de levadura descrita anteriormente ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar un regulador global de síntesis de ácido graso a un nivel alterado en comparación con la célula tipo silvestre, mediante lo cual los niveles de expresión de una pluralidad de genes sintéticos de ácido graso son alterados en comparación con la célula tipo silvestre. En algunos casos,

la enzima de ruta de lípido comprende una enzima que modifica un ácido graso. En algunos casos, la enzima de ruta de lípido es seleccionada de una estearoil-ACP desaturasa y una glicerolípido desaturasa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un microbio que produce aceite que contiene uno o más genes exógenos, en donde los genes exógenos codifican proteína(s) seleccionada(s) del grupo que consiste de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa, un acil-CoA/aldehído reductasa grasa, un aldehído decarboxilasa grasa y una proteína portadora de acilo. En algunos casos, el microbio es *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea* o *Chlorella sp*. En otros casos, el microbio es de otra especie como se describe en la presente. En una modalidad, el gen exógeno está en enlace operable con un promotor, que es inducible o represible en respuesta a un estímulo. En algunos casos, el estímulo es seleccionado del grupo que consiste de una molécula pequeña provista exógenamente, calor, frío y luz. En algunos casos, el gen exógeno es expresado en un compartimiento celular. En algunas modalidades, el compartimiento celular es seleccionado del grupo que consiste de un cloroplasto y una mitocondria.

En una modalidad, el gen exógeno codifica una acil-ACP tioesterasa de ácido graso. En algunos casos, la

tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de una proteína portadora de acilo (ACP). En algunos casos, la tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 átomos de carbono de un ACP. En una modalidad, la tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 átomos de carbono de un ACP.

En una modalidad, el gen exógeno codifica una acil-CoA/aldehído reductasa grasa. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA de 20 a 30 átomos de carbono graso a alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 10 a 14 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente. En una modalidad, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 12 átomos de carbono a dodecanol.

En una modalidad, el gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente. En una modalidad, la reductasa codificada por el gen exógeno

cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 12 átomos de carbono a dodecanal.

En por lo menos una modalidad, el microbio de la invención contiene además uno o más genes de utilización de sacarosa exógenos.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un microbio que contiene dos genes exógenos, en donde un primer gen exógeno codifica una acil-ACP tioesterasa grasa y un segundo gen exógeno codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste de una acil-CoA reductasa grasa, una acil-CoA/aldehído reductasa grasa y una proteína portadora de acilo. En algunos casos, el microbio es *Chlorella minutissima*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.* o *Chlorella protothecoides*. En otros casos, el microbio es otra especie como se describe en la presente. En algunos casos, los dos genes exógenos están cada uno en enlace operable con un promotor, que es inducible en respuesta a un estímulo. En algunos casos, cada promotor es inducible en respuesta a un estímulo idéntico.

En una modalidad, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de un ACP. En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una acil-CoA/aldehído reductasa grasa que cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18

átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 átomos de carbono de un ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 10 a 14 átomos de carbono al alcohol primario correspondiente, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En una modalidad, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 átomos de carbono de un ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 12 átomos de carbono a dodecanol. En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa que cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente.

En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa y el microbio contiene además un tercer gen exógeno que codifica un aldehído descarbonilasa grasa. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de un ACP, la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído graso correspondiente y la descarbonilasa codificada por el

tercer gen exógeno cataliza la conversión de un aldehído graso de 8 a 18 átomos de carbono a un alcano correspondiente, en donde la tioesterasa, la reductasa y la descarbonilasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbonos.

En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa.

En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo y el microbio contiene además un tercer gen exógeno que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste de una acil-CoA reductasa grasa y una acil-CoA/aldehído reductasa grasa. En algunos casos, el tercer gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa y el microbio contiene además un cuarto gen exógeno que codifica un aldehído descarbonilasa grasa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para producir una molécula en una población de microbios. En una modalidad, el método comprende cultivar una población de microbios en un medio de cultivo, en donde los microbios contienen (i) un primer gen exógeno que codifica una acil-ACP tioesterasa grasa y (ii) un segundo gen exógeno que codifica una acil-CoA/aldehído reductasa grasa y los microbios sintetizan un ácido graso enlazado a una proteína portadora de acilo (ACP), la acil-ACP tioesterasa grasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP para producir,

por medio de procesamiento adicional, un acil-CoA graso y la acil-CoA/aldehído reductasa grasa cataliza la reducción del acil-CoA a un alcohol.

En una modalidad el método para producir una molécula en una población de microbios, el microbio es Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp. o Chlorella protothecoides. En otros casos, el microbio es otra especie de microorganismo como se describe en la presente. En algunos casos, el medio de cultivo contiene glicerol. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación. En algunos casos, el medio de cultivo contiene glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fijo. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono fijo es sacarosa. En algunos casos, todo el glicerol y todo de la otra fuente de carbono fija son provistos a los microbios al comienzo de la fermentación. En algunos casos, el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son alimentados a los microbios a una velocidad predeterminada en el curso de la fermentación. En algunos métodos de cultivo de la invención, el glicerol es provisto a los microbios en ausencia de la por lo menos otra fuente de carbono fijo por un primer período de tiempo, la por lo menos otra fuente de carbono fijo es provista al final del primer período de tiempo y los microbios son cultivados por un segundo período de tiempo en presencia de la

por lo menos otra fuente de carbono fijo.

En algunas modalidades, los genes exógenos están en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo. En algunos casos, el método comprende además proveer el primer estímulo e incubar la población de microbios por un primer período de tiempo en presencia del primer estímulo para producir un alcohol. En algunos casos, el método comprende además extraer el alcohol de biomasa acuosa que comprende el medio de cultivo y los microbios.

En algunas modalidades, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de la ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 átomos de carbono de la ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 10 a 14 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En una modalidad, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 átomos de carbono de la ACP y la reductasa

codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 12 átomos de carbono a dodecanol. En algunos casos, los microbios contienen además un tercer gen exógeno que codifica una proteína portadora de acilo. En algunas modalidades, el tercer gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para producir una molécula de lípido en una población de microbios. En una modalidad, el método comprende cultivar una población de microbios en un medio de cultivo, en donde los microbios contienen (i) un primer gen exógeno que codifica una acil-ACP tioesterasa grasa y (ii) un segundo gen exógeno que codifica una acil-CoA reductasa grasa y en donde los microbios sintetizan un ácido graso enlazado a una proteína portadora de acilo (ACP), la acil-ACP tioesterasa grasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP para producir, por medio de procesamiento adicional, un acil-CoA graso y la acil-CoA reductasa grasa cataliza la reducción del acil-CoA a un aldehído. En algunos casos, el microbio es Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp., o Chlorella protothecoides. En otros casos, el microbio es otra especie de microorganismo como se describe en la presente.

En algunas modalidades, los genes exógenos están en

enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y el método comprende además proveer el primer estímulo e incubar la población de microbios por un primer período de tiempo en presencia del primer estímulo para producir un aldehído. En una modalidad, el método comprende además extraer el aldehído de biomasa acuosa que comprende el medio de cultivo y la población de microbios.

En algunas modalidades, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de la ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En algunos casos, los microbios contienen además un tercer gen exógeno que codifica una aldehído descarbonilasa grasa que cataliza la conversión del aldehído a un alcano.

En algunos casos, los genes exógenos están en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y el método comprende además proveer el primer estímulo e incubar la población de microbios por un primer período de tiempo en presencia del primer estímulo para producir un alcano. En algunos casos, el método comprende además extraer el alcano de biomasa acuosa que comprende el medio de cultivo y la población de microbios.

En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de la ACP, reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente y la descarbonilasa codificada por el tercer gen exógeno cataliza la conversión de un aldehído de 8 a 18 átomos de carbono a un alcano correspondiente, en donde la tioesterasa, la reductasa y la descarbonilasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En algunas modalidades, los microbios contienen además un tercer gen exógeno que codifica una proteína portadora de acilo. En algunos casos, el tercer gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa. En algunos casos, los microbios contienen además un cuarto gen exógeno que codifica un aldehído descarbonilasa grasa que cataliza la conversión del aldehído a un alcano.

En algunos métodos, el medio de cultivo contiene glicerol. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación. En algunos casos, el medio de cultivo contiene glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fijo. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono fijo es sacarosa. En algunos casos, todo del glicerol y todo de la por lo menos otra fuente de carbono fija son provistos a los microbios al comienzo de la

fermentación. En algunos casos, el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son alimentados a los microbios a una velocidad predeterminada en el curso de la fermentación. En una modalidad, el glicerol es provisto a los microbios en ausencia de la por lo menos otra fuente de carbono fijo por un primer período de tiempo, la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al final del primer período de tiempo y los microbios son cultivados por un segundo período de tiempo en presencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para producir una molécula de ácido graso que tiene una longitud de cadena de carbono específica en una población de microbios. En una modalidad, el método comprende cultivar una población de microbios productores de lípidos en un medio de cultivo, en donde los microbios contienen un gen exógeno que codifican una acil-ACP tioesterasa grasa que tiene una actividad especifica a una longitud de cadena de carbonos y en donde los microbios sintetizan un ácido graso enlazado a una proteína portadora de acilo (ACP) y la tioesterasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP, cuando el ácido graso ha sido sintetizado a la longitud de cadena de carbono específica. En algunos casos, el microbio es Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp., o Chlorella protothecoides. En otros casos, el microbio es otra especie de

microorganismo como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el gen exógeno está en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y el método comprende además proveer el primer estímulo e incubar la población de microbios por un período de tiempo en presencia del primer estímulo. En algunos casos, el método comprende además extraer el ácido graso de biomasa acuosa que comprende el medio de cultivo y la población de microbios.

En algunos casos, los microbios contienen además un segundo gen exógeno que codifica una proteína portadora de acilo. En algunas modalidades, el segundo gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa. En una modalidad, la acil-ACP tioesterasa cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de la ACP.

En algunos casos, el medio de cultivo contiene glicerol. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación. En algunas modalidades, el medio de cultivo contiene glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fija. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono es sacarosa. En algunos casos, todo del glicerol y todo de la por lo menos otra fuente de carbono fija son provistos a los microbios al comienzo de la fermentación. En algunos casos, el glicerol y la por lo menos

otra fuente de carbono fija son alimentados a los microbios a una velocidad predeterminada en el curso de la fermentación. En una modalidad, el glicerol es provisto a los microbios en ausencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija por un primer período de tiempo, la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al final del primer período de tiempo y los microbios son cultivados por un segundo período de tiempo en presencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una célula de microalga que contiene un gen exógeno, en donde el gen exógeno codifica una proteína seleccionada del grupo de una lipasa, un transportador de sacarosa, una invertasa sacarosa, una fructosinasa o una enzima polisacárido-degradante. En algunos casos, la célula es Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp., o Chlorella protothecoides. En otros casos, la célula es otra especie de microalga como se describe en la presente.

En algunos casos, el gen exógeno está en enlace operable con un promotor. En algunos casos, el promotor es inducible o represible en respuesta a un estímulo. En varias modalidades, el estímulo es seleccionado del grupo que consiste de una molécula pequeña provista exógenamente, calor, frío y luz. En algunos casos, el gen exógeno es expresado en un compartimiento celular. En algunas modalidades, el

compartimiento celular es seleccionado del grupo que consiste de un cloroplasto y una mitocondria.

En algunos casos, el gen codifica una lipasa que tiene por lo menos 70% de identidad de aminoácidos con una lipasa seleccionada de la tabla 9. En una modalidad, la lipasa es novozim-435. En una modalidad, la enzima polisacárido-degradante es endógena a un virus de Chlorella.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una célula de microalga que contiene dos genes exógenos, en donde un primer gen exógeno codifica una lipasa y un segundo gen exógeno codifica una enzima polisacárido-degradante. En algunos casos, los genes exógenos están cada uno en enlace operable con un promotor. En algunos casos, los genes exógenos están cada uno en enlace operable con promotores que son inducibles en respuesta a un estímulo. En algunos casos, los genes exógenos están cada uno en enlace operable con promotores que son inducibles en respuesta al mismo estímulo. En algunos casos, los genes exógenos están cada uno en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a por lo menos un estímulo que no induce el otro promotor.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para la manufactura de una molécula de lípido en un microbio. En una modalidad, el método comprende (a) cultivar el microbio por un primer período de tiempo suficiente para incrementar la densidad celular, en donde el

microbio contiene (i) un gen exógeno que codifica una lipasa y/o (ii) un gen exógeno que codifica una enzima polisacárido-degradante, en donde el (los) gen(es) exógeno(s) está(n) en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un estímulo, (b) proveer el estímulo y (c) incubar el microbio por un segundo período de tiempo en presencia del estímulo.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para la manufactura de una molécula de lípido en un microbio. En una modalidad, el método comprende (a) cultivar un microbio que produce lípido por un primer período de tiempo suficiente para incrementar la densidad celular, (b) proveer un virus capaz de infectar y someter a lisis el microbio cuando está en contacto directo con el microbio y (c) incubar el microbio por un segundo período de tiempo para producir biomasa acuosa sometida a lisis. En una modalidad, el método comprende además extraer moléculas de lípido de la biomasa acuosa sometida a lisis.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una célula de microalga que contiene un gen exógeno, en donde el gen exógeno codifica un co-factor para una enzima de ruta de lípido o codifica una proteína que participa en la síntesis del co-factor.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para cultivar un microbio que produce lípido. En una modalidad, el método comprende cultivar

el microbio en presencia de una cantidad suficiente de uno o más co-factores para una enzima de ruta de lípido para incrementar el rendimiento de lípido microbiano con respecto al rendimiento de lípido microbiano en ausencia del uno o más co-factores. En algunos casos, el uno o más co-factores consisten de una vitamina requerida por una o más enzimas de ruta de lípido. En una modalidad, el uno o más co-factores es biotina. En algunos casos, el uno o más co-factores son provistos al incluir en el cultivo un microbio que ha sido diseñado genéticamente para producir el uno o más co-factores.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para fermentar un microorganismo, que comprende proveer una mezcla que comprende glucosa y xilosa como fuente de energía al microorganismo. En una modalidad, la mezcla comprende además lignina. En una modalidad, la mezcla comprende además por lo menos una especie de furfural. En algunos casos, la mezcla es material celulósico despolimerizado. En algunos casos, la mezcla comprende además por lo menos una enzima de utilización de sacarosa. En una modalidad, la mezcla comprende una invertasa sacarosa.

En algunos casos, el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de Bracteococcus minor, Chlorella ellipsoidea, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Bracteococcus medionucleatus, Chlorella minutissima, Chlorella ovalis, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila,

Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella vulgaris, Parachlorella kessleri, Prototheca moriformis, y Pseudochlorella aquatica. En otros casos, el microorganismo es otra especie de microorganismo como se describe en la presente. En algunos casos, el microorganismo ha sido diseñado genéticamente para expresar un gen exógeno que codifica por lo menos una enzima de modificación de lípidos, enzima de modificación de hidrocarbonos o enzima de utilización de sacarosa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para cultivar una microalga, que comprende cultivar la microalga en un medio de cultivo que incluye una materia prima de alimentación que comprende por lo menos un sustrato de carbono seleccionado del grupo que consiste de un material celulósico, un azúcar de 5 átomos de carbono, un azúcar de 6 átomos de carbono y un acetato. En algunos casos, el sustrato de carbono es glucosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Parachlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus, Prototheca y Scenedesmus. En algunos casos, el sustrato de carbono es xilosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Pseudochlorella, y Prototheca. En algunos casos, el sustrato de carbono es sacarosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, and Bracteococcus. En algunos casos,

el sustrato de carbono es fructosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Parachlorella, Prototheca, y Scenedesmus. En algunos casos, el sustrato de carbono es arabinosa y la microalga es Chlorella sp. En algunos casos, el sustrato de carbono es manosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Parachlorella, Bracteococcus, Prototheca, y Scenedesmus. En algunos casos, el sustrato de carbono es galactosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Bracteococcus, Parachlorella, , Chlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus, y Prototheca. En algunos casos, el sustrato de carbono es acetato y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de Chlorella, Parachlorella, y Prototheca.

En una modalidad, el medio de cultivo incluye además por lo menos una enzima de utilización de sacarosa. En algunos casos, la microalga ha sido diseñada genéticamente para expresar un gen exógeno que codifica por lo menos una enzima de modificación de lípidos, enzima de modificación de hidrocarbonos o enzima de modificación de sacarosa. En algunos casos, el medio de cultivo incluye una invertasa sacarosa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para el cultivo de microalga que comprende colocar una pluralidad de células de microalgas en presencia de material celulósico despolimerizado. En algunos

casos, las microalgas son cultivadas en presencia de una fuente de carbono fija adicional seleccionada del grupo que consiste de glicerol, sacarosa, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, fructosa, arabinosa, manosa, acetato y cualquier combinación de las anteriores. En una modalidad, las microalgas son cultivadas en presencia de por lo menos una enzima de utilización de sacarosa.

En algunos casos, las microalgas son seleccionadas de una especie del género Bracteococcus, una especie del género Chlorella, una especie del género Parachlorella, una especie del género Prototheca, o una especie del género Pseudochlorella. En algunos casos, la microalga es seleccionada de Bracteococcus minor, Chlorella ellipsoidea, Chlorella kessleń, Chlorella luteoviridis, Bracteococcus medionucleatus, Chlorella minutissima, Chlorella ovalis, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella vulgaris, Parachlorella kessleri, Prototheca moriformis, y Pseudochlorella aquatica. En otros casos, la microalga es otra especie de microalga como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la microalga ha sido diseñada genéticamente para expresar un gen exógeno que codifica por lo menos una enzima de modificación de lípidos, enzima de modificación de hidrocarbonos o enzima de modificación de sacarosa. En una modalidad, la por lo menos una enzima de

utilización de sacarosa es una invertasa sacarosa. En algunos casos, la por lo menos una enzima de modificación de lípidos es seleccionada de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, un acetil-CoA carboxilasa y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa. En algunos casos, la por lo menos una enzima de modificación de hidrocarbonos es seleccionada de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, una aldehído reductasa grasa, una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, un aldehído descarboxilasa grasa y una proteína portadora de acilo.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para cultivar un microbio que produce lípido, el método comprende cultivar el microbio en presencia de ácido acético y en ausencia de una fuente de nitrógeno fija. En algunos casos, el microbio es cultivado en presencia de una cantidad suficiente de ácido acético para incrementar el rendimiento de lípido microbiano con respecto al rendimiento de lípido microbiano en ausencia de ácido acético, en donde las condiciones de cultivo son de otra manera las mismas entre los dos cultivos.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un cultivo microbiano que contiene una población de microorganismos y un medio de cultivo que comprende glucosa, xilosa y una molécula seleccionada del grupo que consiste de lignina y una especie de furfural. En algunos

casos, los microorganismos son seleccionados de *Bracteococcus minor, Chlorella ellipsoidea, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Bracteococcus medionucleatus, Chlorella minutissima, Chlorella ovalis, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella vulgaris, Parachlorella kessleri, Prototheca moriformis* y *Pseudochlorella aquatica*. En otros casos, los microorganismos son otra especie de microorganismos como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para cultivar microalgas. En una modalidad, el método comprende a)proveer una célula de microalga apta de efectuar crecimiento heterotrófico, b) colocar la célula de microalga en medios de cultivo, en donde los medios de cultivo comprenden material celulósico despolimerizado y c)incubar la microalga por un periodo de tiempo suficiente para permitir que la célula crezca.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente, con un método de manufactura de biodiesel. En una modalidad, el método comprende a) cultivar un microorganismo que produce lípido en un primer cultivo microbiano, b) recuperar el lípido de la biomasa producida por el primer cultivo microbiano, c)someter el lípido a transesterificación para producir éster (s) de ácido graso y glicerol y d)agregar el glicerol a un segundo cultivo microbiano. En algunos casos,

los primeros y segundos cultivos microbianos son cultivos de la misma especie de microorganismos. En algunos caso, el segundo cultivo microbiano comprende microorganismo seleccionado del grupo que consiste de *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* y *Chlorella sorokiniana.* En otros casos, el segundo cultivo microbiano comprende otra especie de microorganismo como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método de fermentación que comprende el cultivo de un microorganismo en presencia de glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fija. En algunos casos el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son productos al microorganismo simultáneamente a una proporción predeterminada. En algunos casos, todo el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son provistos al microorganismo al comienzo de la fermentación. En algunos casos, todo el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son alimentados al microorganismo a una velocidad predeterminada durante el curso de la fermentación. En una modalidad del método, se provee glicerol al microorganismo en ausencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija por un primer periodo de tiempo, la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al final del primer periodo de tiempo y el microorganismo es

cultivado por un segundo periodo de tiempo en presencia de por lo menos otra fuente de carbono fija. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono fija es alimentada al microorganismo a una velocidad predeterminada durante el segundo periodo de tiempo. En algunos casos, todo de la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al microorganismo al final del primer periodo de tiempo. En una modalidad del método, la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al microorganismo en ausencia de glicerol por un primer periodo de tiempo, el glicerol es provisto al final del primer periodo de tiempo y el microorganismo es cultivado por un segundo periodo de tiempo en presencia de glicerol. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación. En una modalidad, el glicerol es acidulado. En otra modalidad, el glicerol no es acidulado. En algunos casos, la por lo menos otra fuente de carbono fija es glucosa. En algunos casos, la por lo menos otra fuente de carbono fija es material celulósico despolimerizado. En una modalidad, la por lo menos otra fuente de carbono fija es sacarosa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un fermentador que comprende una población de microorganismos, glicerol y por lo menos un azúcar seleccionado del grupo que comprende de xilosa, glucosa y sacarosa. En una modalidad, el glicerol es un producto secundario de un proceso

de transesterificación de lípido. En algunos casos, los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* y *Chlorella sorokiniana.* En otros casos, los microorganismos son otra especie como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un método para la fermentación de un microorganismo. En una modalidad, el método comprende proveer producto secundario de glicerol de un proceso de transesterificación como una sola fuente de energía de carbono fijo. En una modalidad, no se proporciona energía de luz al microorganismo. En otra modalidad, se proporciona energía de luz al microorganismo. En algunos casos, el microorganismo es seleccionado de *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* y *Chlorella sorokiniana.* En otros casos, el microorganismo es otra especie como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un microorganismo que contiene un gen de utilización de sacarosa exógeno. En una modalidad, el gen codifica un transportador de sacarosa. En una modalidad, el gen codifica una invertasa sacarosa. En una modalidad, el gen

codifica una fructocinasa. En algunos casos, el microorganismo es una especia seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellepsoidea, Chlorella sp. y Chlorella protothecoides*. En otros casos, el microorganismo es otra especie como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una célula de la especia *Chlorella protothecoides, Chlorella emersonii* o *Chlorella minutissima,* en donde la célula contiene un gen exógeno. En algunos casos, el gen exógeno codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste de un transportador de sacarosa, una invertasa sacarosa, una enzima de modificación de lípido, una enzima de modificación de hidrocarburo y una fructocinasa. En algunas modalidades, la proteína es una invertasa sacarosa secretada al espacio extracelular. En algunas modalidades, la proteína es una invertasa sacarosa apuntada al citoplasma.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un cultivo microbiano que contiene una población de microorganismos y un medio de cultivo que comprende i) sacarosa y ii) una enzima de invertasa sacarosa.

En otro aspecto, la presente inversión es concerniente con un cultivo microbiano que contiene una población de microorganismos y un medio de cultivo que comprende i) melasas y ii) una enzima de invertasa sacarosa.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un cultivo microbiano que contiene una población de microorganismos y un medio de cultivo que comprende i) sacarosa, ii) lignina y iii) una enzima de invertasa sacarosa.

En los varios cultivos microbianos descritos anteriormente, los microorganismos contienen por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno. En algunas modalidades, el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa y una fructocinasa. En una modalidad, la enzima invertasa sacarosa es una enzima de invertasa sacarosa secretable codificada por un gen de invertasa sacarosa exógeno expresado por la población de microorganismos. En algunos casos, los microorganismos contienen por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido o una enzima de modificación de hidrocarburo.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un ácido nucléico que comprende un cADN que codifica un gen de utilización de sacarosa y un cADN que codifica una proteína que confiere resistencia al antibiótico higromicina o el antibiótico G418.

En modalidades de los varios métodos, composiciones, células, microorganismos, microbios, cultivos microbianos, fermentadores y los semejantes, descritos anteriormente, el

microorganismo o microbio puede ser una microalga, una levadura oleaginosa, un hongo o una bacteria, a no ser que se especifique de otra manera. En algunos casos, el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la tabla 1. En algunos casos, el microorganismo es una especie del género *Chlorella*. En algunos casos, el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de *Chlorella anitrata, Chlorella antárctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. Vacuolata, Chlorella glocotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusioum var Actophila, Chlorella infusioum var. Auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. Aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothercoides, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. Minima, Chlorella regularis var. Umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vannielli, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var airidis, Chlorella*

vulgaris var vulgaris, Chlorella vulgaris var vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var vulgaris f. viridis, Chlorella xantella y Chlorella zofingiensis. En algunos casos, el microorganismo es una levadura oleaginosa seleccionada del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces satarkeyi lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis y Yarrowia lipolytica.* En algunos casos, el microorganismo es un hongo seleccionada del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella, Mortierella vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus achraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacium,* una especie del género *Hansenulo,* una especie del género *Chaetomium,* una especie del género *Cladosporium,* una especie del género *Malbranchea,* una especie de género *Rhizopus* y una especie del género *Pythium.*

En las varias modalidades descritas anteriormente, el microorganismo puede contener por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno. En algunos casos, el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa o una fructocinasa.

En las varias modalidades descritas anteriormente, el microorganismo puede contener por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido. En algunos casos, la

enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de una esteaoril-ACP desaturasa, un glicerolípido desaturasa, un piruvato deshidrogenasa, una acetil- CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3-fosfatoaciltransferasa.

En las varias modalidades descritas anteriormente, el microorganismo puede contener por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de modificación de hidrocarburo. En algunos casos, la enzima de modificación de hidrocarburo es seleccionada del grupo que consiste de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil- CoA/aldehído reductasa grasa, una acil- CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa, un aldehído descarbonilasa grasa y/o una proteína portadora de acilo.

Cualquiera de dos o más de las varias modalidades descritas anteriormente pueden ser combinadas conjuntamente para producir modalidades adicionales abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

BREVE DEESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra el peso de células seco por litro de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con y sin glucosa adicional.

La figura 2 muestra el peso de células seco por litro de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son

cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional.

La figura 3 muestra las concentraciones de lípido relativas de cultivo de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional.

La figura 4 muestra la concentración de lípido de cultivo de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivados en presencia de varios tipos de glicerol con y sin glucosa adicional.

La figura 5 muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de dos especies y cepa de *Chlorella* cuando son cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional, en donde el glicerol es agregado secuencialmente después de glucosa.

La figura 6 muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de dos especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivados en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional.

La figura 7 muestra la concentración de lípido relativa de cultivos de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivados en presencia de glucosa al 2% y glucosa al 1% más glicerol grado reactivo al 1%.

La figura 8 muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de múltiples especies y cepas de *Chlorella*

cuando son cultivadas en presencia de glucosa con y sin glicerol grado reactivo, en donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

La figura 9 muestra la concentración de lípido relativa de cultivos de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivados en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional, en donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

La figura 10 muestra el peso de célula seca por litro de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivadas en presencia de varios tipos de glicerol con glucosa adicional, en donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

La figura 11 (a) muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de *Spirulina platensis* cuando es cultivada en presencia de glucosa, glicerol grado reactivo, producto secundario de glicerol de biodiesel sin acidular y una combinación de glicerol y glucosa.

La figura 11 (b) muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de *Navicula pelliculosa* cuando es cultivada en presencia de varios tipos de glicerol en presencia de combinaciones de glicerol y glucosa.

La figura 12 (a) muestra el lípido como porciento de peso de célula seca de *Scenedesmus armatus* cuando es cultivado en presencia de varios tipos de glicerol y en presencia de una

combinación de glicerol y glucosa.

La figura 12 (b) muestra el peso de célula seca por litro de *Scenedesmus armatus* cuando es cultivado en presencia de varios tipos de glicerol y en presencia de una combinación de glicerol, producto secundario de biodiesel y glucosa.

La figura 13 muestra el peso seco de célula por litro de *Navicula pelliculosa* cuando es cultivada en presencia de varios tipos de glicerol y en presencia de una combinación de glicerol, producto secundario de biodiesel sin acidular y glucosa.

La figura 14 muestra el peso de célula seca por litro de *Scenedesmus armatus* y *Navicula pelliculosa* cuando son cultivados en presencia de glicerol, producto secundario de biodisel acidulado y sin acidular con glucosa adicional, en donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

La figura 15 muestra un efecto sinergístico con la combinación de xilosa y glucosa sobre el crecimiento de *Chlorella* en comparación con xilosa o glucosa solos.

La figura 16 muestra el genotipo de transformante de *Chlorella protothecoides* que contiene un gen exógeno.

La figura 17 muestra el uso de codón de *Chlorella protothecoides*.

La figura 18 muestra el uso de codón de *D. salina* y *Chlorella pyrenoidosa*.

La figura 19 muestra a) glicerol grado reactivo; b) glicerol producto secundario de biodiesel sin acidular y c) glicerol producto secundario de diesel acidulado, todos los cuales fueron usados en los experimentos descritos en los ejemplos.

La figura 20 muestra el cultivo de *Chlorella protothecoides* sobre glucosa y fructosa.

La figura 21 muestra el cultivo de *Chlorella fusca* sobre sacarosa al 1%.

La figura 22 muestra el cultivo de *Chlorella kessleri* sobre sacarosa al 1%.

La figura 23 muestra el peso seco de célula por litro de *Chlorella protothecoides* cuando es cultivada en presencia de glucosa, sacarosa o una de varias muestras de melasa (designadas BS1, BS2 y HTM) en presencia o ausencia de una invertasa de sacarosa.

La figura 24 muestra el cultivo de *Chlorella protothecoides* cuando es cultivado en presencia de glucosa, sacarosa o una de varias muestras de melasa (designadas BS1, BS2 y HTM) en presencia o ausencia de una invertasa de sacarosa tal como es medida por la densidad celular relativa.

La figura 25 muestra una imitación de varios conceptos de plásmido de invertasa de levadura (SUC2) con tres diferentes promotores (designados CMV, CV y HUP1) también como sitios de restricción útiles para la sub-clonación.

La figura 26 muestra el genotipo de transformantes de *Chlorella protothecoides* seleccionados sobre sacarosa en la obscuridad que contiene un gen de invertasa sacarosa exógeno.

La figura 27 muestra el genotipo células de *Chlorella protothecoides* transformadas con un gen que codifica una invertasa de sacarosa secretada de *S. cerevisiae*.

La figura 28 muestra el genotipo células de *Chlorella minutissima y Chlorella emersonii* transformadas con un gen que codifica una invertasa de sacarosa secretada de *S. cerevisiae*.

La figura 29 ilustra un cromatógrafo de gases generado mediante análisis de un producto de diesel renovable producido de acuerdo con los métodos de la presente invención de descrito en el ejemplo 27.

La figura 30 ilustra una gráfica de la distribución del punto de ebullición para un producto de diesel renovable producido de acuerdo con los métodos de la presente invención y descrito en el ejemplo 27.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

A no ser que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos mostrados en la presente tienen el significado entendido comúnmente por una persona experimentada en el arte con el cual la invención es concerniente. Las siguientes referencias proporcionan a aquel

de habilidad ordinaria una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton *et al., Dictionary of microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genectics, 5th Ed.*, R.Rieger *et al. (eds.)*, Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology (1991).* Como se usa en la presente los siguientes términos, tienen los significados adscritos a ellos a no ser que se especifique de otra manera.

Como se usa con referencia a un ácido nucléico, "activo en microalgas" se refiere e un ácido nucléico que es funcional en microalgas. Por ejemplo, un promotor que ha sido usado para impulsar un gen de resistencia a antibiótico a impartir resistencia a antibiótico a una microalga transgénica es activo en microalgas. Ejemplos de promotores activos en microalgas son promotores endógenos a ciertas especies de algas y promotores encontrados en virus de plantas.

Una "proteína portadora de acilo" o "ACP" es una proteína que se enlaza, a una cadena de acilo creciente durante la síntesis de acido graso como un tioléster en el tiol distante d la porción de 4'-fosfopanteteína y comprende un componente del complejo de sintasa de acido graso. La frase "co-expresado naturalmente" con referencia a una proteína portadora de acilo en conjunción con una síntesis – ACP tioesterasa grasa significa que la ACP y la tioesterasa son co-

expresados naturalmente en un tejido u organismo del cual son derivados, por ejemplo debido a que los genes que codifican las dos enzimas están bajo el control de una secuencia regulatoria común o debido a que son expresados en respuesta al mismo estimulo.

Una "molécula de acil-CoA" o "acil-CoA" es una molécula que comprende una porción de acilo anexada covalentemente a la Co-enzima A por medio de un enlace de tioléster en el tiol distante de la porción e 4'-fosfopanteteína de la Co-enzima A.

"Axénico" significa un cultivo de un organismo que está libre de recombinación por otros organismos vivientes.

"Biodiesel" es un alquiléster de ácido graso producido biológicamente apropiado para uso como combustible en un motor a diesel.

El término "biomasa" se refiere al material producido mediante el cultivo y/o propagación de células. La biomasa puede contener células y/o contenido intracelular, también como material extracelular. El material extracelular incluye pero no está limitado a compuestos secretados por una célula.

"Biorreactor" significa un envolvente o envolvente parcial en el cual las células son cultivadas, opcionalmente en suspensión.

Como se usa en la presente, "catalizador" se refiere a un agente, tal como una molécula o complejo macromolecular,

apto de facilitar o promover una reacción química de un reactivo a un producto sin volverse parte del producto. Así, un catalizador incrementa la velocidad de una reacción, después de lo cual, el catalizador puede actuar sobre otro reactivo para formar el producto. Un catalizador disminuye en general la energía de activación global requerida para la reacción, de tal manera que procede más rápidamente o a una temperatura más baja. Así, un equilibrio de reacción se puede obtener más rápidamente. Ejemplos de catalizadores incluyen enzimas, que son catalizadores biológicos, calor, que es un catalizador no biológico y catalizadores de metal usado en procesos de refinación de petróleo fósil.

"Material celulósico" significa los productos de digestión de celulosa, en los que se incluye glucosa y xilosa, y opcionalmente compuestos adicionales tales como disacáridos, oligosacáridos, lignina, furfurales y otros compuestos. Ejemplos no limitantes de fuentes de material celulósico incluyen bagasas de caña de azúcar, pulpa de remolacha de azúcar, rastrojo de maíz, fragmentos de madera, aserrín y pasto varilla.

El término "co-cultivo" y variantes del mismo, tales como "co-cultivar", se refiere a la presencia de dos o más tipos de células en el mismo bioreactor. Los dos o más tipos de células pueden ambos ser microorganismos, tales como microalgas o pueden ser una célula de microalga cultivada con un diferente

tipo de célula. Las condiciones de cultivo pueden ser aquellas que refuerzan el crecimiento y/o propagación de los dos o más tipos de células o aquellos que facilitan el crecimiento y/o proliferación de una o un subconjunto, de las dos o más células, en tanto que mantienen el crecimiento celular para el resto.

El término "co-factor" es usado en la presente para referirse a cualquier molécula, diferente al sustrato, que es requerida para que una enzima lleve a cabo su actividad enzimática.

Como se usa en la presente, "ADN complementario" ("cADN") es una representación de ADN de mARN, obtenido usualmente mediante transcripción inversa de ARN mensajero (mARN) o amplificación (por ejemplo, vía reacción en cadena de polimerasa ("PCR")).

El término "cultivado" y variantes del mismo, se refieren al refuerzo no intencional del crecimiento (incrementos en tamaño de célula, contenido celular, y/o actividad celular) y/o propagación (incrementos en números de células vía mitosis) de una o más células mediante el uso de condiciones de cultivo propuestas. La combinación de tanto de cultivo como propagación puede ser denominada proliferación. La una o más células pueden ser aquellas de un microorganismo, tales como microalgas. Ejemplos de condiciones propuestas incluyen el uso de un medio definido (con características

conocidas tales como pH, fuerza iónica y fuente de carbono), temperatura especificada, tensión de oxígeno, niveles de dióxido de carbono y crecimiento en un bioreactor. El término no se refiere a crecimiento o propagación de microorganismos en la naturaleza o de otra manera sin intervención humana directa, tal como crecimiento natural de un organismo que finalmente se convierte en fósil para producir petróleo crudo geológico.

Como se usa en la presente, el término "citólisis" se refiere a la lisis de células en un medio ambiente hipotónico. La citólisis es provocada por osmosis excesiva o movimiento de agua, hacia el interior de una célula (hiperhidratación). La célula no puede soportar la presión osmótica del agua al interior y así explota.

Como se usa en la presente, los términos "vector de expresión" o "constructo de expresión" se refieren a un constructo de ácido nucleico, generado recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Comúnmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico a ser transcrito enlazado operativamente a un promotor.

"Gen exógeno" se refiere a un ácido nucleico transformado a una célula. Una célula transformada puede ser

denominada como célula recombinante, a la cual gen(es) exógeno(s) adicional(s) puede(n) ser introducido(s). El gen exógeno puede ser de una especie diferente (y así heterólogo) o de la misma especie (y así homólogo) en relación con la célula que es transformada. En el caso de un gen homólogo, ocupa a sitio diferente en el genoma de la célula en relación con la copia endógena del gen. El gen exógeno puede estar presente en más de una copia en la célula. El gen exógeno puede ser mantenido en una célula como una inserción al genoma o como una molécula episomal.

"Provisto exógenamente" describe una molécula provista al medio de cultivo de un cultivo celular.

Como se usa en la presente, una "acil-ACP tioesterasa grasa" es una enzima que cataliza la escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis del lípido.

Como se usa en la presente, una "acil-CoA/aldehído reductasa grasa" es una enzima que cataliza la reducción de una molécula de acil-CoA a un alcohol primario.

Como se usa en la presente, una "acil-CoA reductasa grasa" es una enzima que cataliza la reducción de una molécula de acil-CoA a un aldehído.

Como se usa en la presente, una "aldehído descarbonilasa grasa" es una enzima que cataliza la conversión de un aldehído graso a un alcano.

Como se usa en la presente, una "aldehído reductasa grasa" es una enzima que cataliza la reducción de un aldehído a un alcohol primario.

"Fuente de carbono fija" significa molécula(s) que contiene(n) carbono, preferiblemente orgánico, que está presente a la temperatura y presión ambiental en forma sólida o líquida.

"Hongo", como se usa en la presente, significa organismos heterotróficos caracterizados por una pared celular quitinosa del reino de hongos.

"Homogenado" significa biomasa que ha sido sometida a disrupción físicamente.

Como se usa en la presente, "hidrocarburo" se refiere a: (a) una molécula que contiene solamente átomos de hidrógeno y carbono, en donde los átomos de carbono están enlazados covalentemente para formar una cadena fundamental lineal, ramificada, típica o parcialmente típica a la cual los átomos de hidrógeno están unidos; o (b) una molécula que solo contiene principalmente átomos de hidrógeno y carbono y que puede ser convertida para contener solamente átomos de hidrógeno y carbono mediante una a cuatro reacciones químicas. Ejemplos no limitantes de los últimos incluyen hidrocarburos que contienen un átomo de oxígeno entre un átomo de carbono y un átomo de hidrógeno para formar una molécula de alcohol, también como aldehídos que contienen un solo átomo de oxígeno. Métodos para

la reducción de alcoholes a hidrocarburos que contienen solamente átomos de carbono e hidrógeno son bien conocidos. Otro ejemplo de un hidrocarburo es un éster, en el cual un grupo orgánico reemplaza un átomo de hidrógeno (o más de uno) en un oxígeno ácido. La estructura molecular de los compuestos de hidrocarburo varía de la forma más simple, en la forma de metano (CH_4), que es un constituyente de gas natural, a las muy pesadas muy complejas, tales como algunas moléculas tales como asfaltenos encontrados en petróleo crudo, petróleo y betunes. Los hidrocarburos pueden estar en forma gaseosa, líquida o sólida o cualesquier combinaciones de estas formas y pueden tener uno o más doble o triples enlaces entre átomos de carbono adyacentes en la cadena fundamental. Así, el término incluye alcanos lineales, ramificados, cíclicos o parcialmente cíclicos, alquenos, lípidos y parafina. Ejemplos incluyen propano, butano, pentano, hexano, octano, trioleína y escualeno.

"Enzima de modificación de hidrocarburo" se refiere a una enzima que altera la estructura covalente de un hidrocarburo. Ejemplos de enzimas de modificación de hidrocarburo incluyen una lipasa, una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa y un aldehído descarbonilasa grasa. Compuestos producidos por la actividad enzimática de enzimas de modificación de hidrocarburo, en los

que se incluyen ácidos grasos, alcoholes, aldehídos, alcanos y otros compuestos derivados de los mismos son denominados en la presente de manera intercambiable como hidrocarburos o lípidos.

El término "proporción de hidrógeno:carbono" se refiere a la proporción de átomos de hidrógeno a átomos de carbono en una molécula en base de átomo a átomo. La proporción puede ser usada para referirse al número de átomos de carbono e hidrógeno en una molécula de hidrocarburo. Por ejemplo, el hidrocarburo con la proporción más alta es metano CH_4 (4:1).

"Fracción hidrofóbica" se refiere a la porción o fracción, de un material que es más soluble en una fase hidrofóbica en comparación con una fase acuosa. Una fracción hidrofóbica es sustancialmente insoluble en agua y usualmente no polar.

Como se usa en la presente, la frase "incremento de rendimiento de lípido" se refiere a un incremento en la productividad de un cultivo microbiano al incrementar por ejemplo el peso seco de células por litro de cultivo, incrementar el porcentaje de células que constituyen el lípido o incrementar la cantidad global de lípido por litro de volumen de cultivo por tiempo unitario.

Un "promotor inducible" es uno que modera la transcripción de un gen enlazado operativamente en respuesta a un estímulo particular.

Como se usa en la presente, la frase "en enlace

operable" se refiere a un enlace funcional entre dos secuencias, tal como una secuencia de control (comúnmente un promotor) y la secuencia enlazada. Un promotor está en enlace operable con un gen exógeno si puede moderar la transcripción del gen.

El término "*in situ*" significa "en el lugar" o "en su posición original". Por ejemplo, un cultivo puede contener una primera microalga que segrega un catalizador y un segundo microorganismo que segrega un sustrato, en donde los primeros y segundos tipos de células producen los componentes necesarios para que una reacción química particular ocurra *in situ* en el co-cultivo sin requerir separación adicional o procesamiento de los materiales.

Una "concentración limitante de un nutriente" es una concentración en un cultivo que limita la propagación de un organismo cultivado. Una "concentración no limitante de un nutriente" es una concentración que soporta la propagación máxima durante un período de cultivo dado. Así, el número de células producida durante un período de cultivo dado es menor en presencia de una concentración limitante de un nutriente que cuando el nutriente es no limitante. Se dice que un nutriente está "en exceso" en un cultivo, cuando el nutriente está presente en una concentración mayor que aquella que soporta la propagación máxima.

Como se usa en la presente, una "lipasa" es una

enzima soluble en agua que cataliza la hidrólisis de enlaces de éster en sustratos lípidos insolubles en agua. Las lipasas catalizan la hidrólisis de lípidos a gliceroles y ácidos grasos.

Como se usa en la presente, una "enzima de ruta de lípido" es cualquier enzima que juega un papel en el metabolismo del lípido, esto es, ya sea en síntesis, modificación o degradación del lípido. Este término abarca proteínas que modifican químicamente lípidos, también como proteínas portadoras.

"Lípidos" son una clase de hidrocarburos que son solubles en solventes no polares (tales como éter y cloroformo) y son relativa o completamente insolubles en agua. Las moléculas de lípido tienen estas propiedades debido a que consisten extensamente de colas de hidrocarburo largas que son hidrofóbicas por la naturaleza. Ejemplos de lípidos incluyen ácidos grasos (saturados e insaturados); glicéridos o glicerolípidos (tales como monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos o grasas neutras y fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos); no glicéridos (esfingolípidos, esterol lípidos en los que se incluyen colesterol y hormonas esteroides, prenol lípidos en los que se incluyen terpenoides, alcoholes grasos, ceras y policétidos); y derivados de lípidos complejos (lípidos azúcar-enlazados o glicolípidos y lípidos proteína-enlazados). "Grasas" son un subgrupo de lípidos

llamados “triacilglicéridos”.

Como se usa en la presente, el término “lisado” se refiere a una solución que contiene el contenido de células sometidas a lisis.

Como se usa en la presente, el término “lisis” se refiere al rompimiento de la membrana celular y opcionalmente la pared celular de un organismo biológico suficiente para liberar por lo menos algo de contenido intracelular, frecuentemente mediante mecanismos mecánicos, virales u osmóticos que comprometen su integridad.

Como se usa en la presente, el término “someter a lisis” se refiere a la disrupción de la membrana celular y opcionalmente la pared celular de un organismo biológico o célula suficiente para liberar por lo menos algo de contenido intracelular.

“Microalga” significa un organismo microbiano eucariótico que contiene un cloroplasto y opcionalmente que es apto de efectuar fotosíntesis o un organismo microbiano procarióntico apto de efectuar fotosíntesis. Las microalgas incluyen fotoautótrofos obligados, que no pueden metabolizar una fuente de carbono fija como energía, también como heterótrofos, que pueden vivir solamente de una fuente de carbono fija. Las microalgas se pueden referir a organismos unicelulares que separan de células hermanas brevemente después de la división celular, tales como *Chlamydomonas* y puede

también referirse a microbios tales como por ejemplo, *Volvox*, que es un microbio fotosintético multicelular simple de dos tipos de células distintas. "Microalgas" también se pueden referir a células tales como *Chlorella* y *Dunaliella*. "Microalgas" también incluyen otro organismos fotosintéticos microbianos que exhiben adhesión de célula-célula, tales como *Agmenellum*, *Anabaena* y *Pyrobotrys*. "Microalgas" también incluyen microorganismos heterotróficos obligados que han perdido la habilidad de efectuar fotosíntesis, tales como ciertas especies de algas dinoflageladas.

Los términos "microorganismo" y "microbio" son usados intercambiablemente en la presente para referirse a organismos unicelulares microscópicos.

"Levadura oleaginosa", como se usa en la presente, significa levadura que puede acumular naturalmente más del 10% de su peso de célula seco como lípido y puede hacer esto como resultado de diseño genético. Levaduras oleaginosas incluyen organismos tales como *Yarrowia lipolytica*, también como cepas diseñadas de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae* que han sido diseñadas para acumular más del 10% de su peso seco de célula como lípidos.

Como se usa en la presente, el término "choque osmótico" se refiere a la ruptura de células en una solución enseguida de una reducción repentina de presión osmótica. El choque osmótico es inducido algunas veces a liberar componentes

celulares de tales células a una solución.

"Fotobioreactor" se refiere a un recipiente, por lo menos parte del cual es por lo menos parcialmente transparente o parcialmente abierto, permitiendo mediante esto que la luz pase a través del mismo, en el cual una o más células de microalgas son cultivadas. Los fotobioreactores pueden ser cerrados, como en el caso de una bolsa de polietileno o matraz Erlenmeyer o pueden ser abiertos al medio ambiente, como en el caso de una laguna a la intemperie.

Como se usa en la presente, una "enzima polisacárido-degradante" se refiere a cualquier enzima apta de catalizar la hidrólisis o despolimerización de cualquier polisacárido. Por ejemplo, las celulasas catalizan la hidrólisis de celulosa.

"Polisacáridos" (también llamados "glicanas") son carbohidratos compuestos de monosacáridos unidos conjuntamente mediante enlaces glicosídicos. La celulosa es un ejemplo de un polisacárido que compone ciertas paredes de células de planta. La celulosa puede ser despolimerizada mediante enzimas para producir monosacáridos tales como xilosa y glucosa, también como disacáridos y oligosacáridos más grandes.

"Compuerta", en el contexto de un bioreactor, se refiere a un orificio en el bioreactor que permite la afluencia o salida de materiales tales como gases, líquidos y células. Los puertos son conectados usualmente a tubería que conduce del fotobioreactor.

Un “promotor” es definido como un arreglo de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en la presente, un promotor incluye las secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de transcripción, tal como en el caso de un promotor tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos de mejorador o represor distantes, que pueden estar ubicados tanto como varios miles de pares de bases del sitio de inicio de transcripción.

Como se usa en la presente, el término “recombinante” cuando es usado con referencia por ejemplo a una célula o ácido nucleico, proteína o vector indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno o proteína o la alteración de un ácido nucleico natural o proteína o que la célula es derivada de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no son encontrados en la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que son de otra manera expresados anormalmente, sub-expresados o no expresados. El término “ácido nucleico recombinante” en la presente significa ácido nucleico, originalmente formado in Vitro, en general mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo utilizando polimerasas y endonucleasas en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza. De esta manera, se obtiene el

enlace operativo de diferentes secuencias. Así, un ácido nucleico aislado, en forma lineal o un vector de expresión formado in Vitro mediante irrigación de moléculas de ADN que no están normalmente unidas, son ambos considerados recombinantes para los propósitos de esta invención. Se comprenderá que una vez que un ácido nucleico recombinante es elaborado y reintroducido a una célula huésped u organismo, se replicará no recombinantemente, esto es utilizando la maquinaria celular in vivo de la célula huésped, en lugar de manipulaciones in Vitro; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos recombinantemente, aunque subsecuentemente resultados no recombinantemente, son todavía considerados recombinantes para los propósitos de la invención. Similarmente, una "proteína recombinante" es una proteína elaborada utilizando técnicas recombinantes, esto es, por medio de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se ilustra anteriormente.

Como se usa en la presente, el término "diesel renovable" se refiere a alcanos (tales como C: 10:0, C12:0, C:14:0, C16:0 y C18:0) producidos por medio de hidrogenación y desoxigenación de lípidos.

Como se usa en la presente, el término "sonificación" se refiere a un proceso para someter a disrupción materiales biológicos, tales como una célula, mediante el uso de energía de ondas de sonido.

"Especie de furfural" se refiere a 2-

furancarboxaldehído o un derivado del mismo que retiene las mismas características estructurales básicas.

Como se usa en la presente, "rastrojo" se refieren a estacas secas y hojas de una cosecha restante después que un grano ha sido cosechado.

Un "gen de utilización de sacarosa" es un gen que cuando es expresado, ayuda en la habilidad de una célula para utilizar sacarosa como fuente de energía. Las proteínas codificadas por un gen de utilización de sacarosa son denominadas en la presente como "enzimas de utilización de sacarosa" e incluyen transportadores de sacarosa, invertasas de sacarosa y exosinasas tales como glucosinasas y fructosinasas.

"Desperdicio de agua" es desperdicio acuoso que contiene comúnmente agua de lavado, desperdicio de lavandería, heces, orina y otros desperdicios líquidos o semilíquidos. Incluyen algunas formas de desperdicio municipal también como aguas cloacales tratadas secundariamente.

Por comparación de secuencias para determinar el porciento de identidad de nucleótidos o aminoácidos, comúnmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la cual las secuencias de prueba son comparadas. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia son introducidas a una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencia.

Luego, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porciento de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa designados.

Alineación óptima de secuencias por comparación se pueden llevar a cabo por ejemplo mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. MoI. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similaridad de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de éstos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de elementos de programación de Wisconsin Genetics, Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase en general Ausubel et al, supra).

Otro algoritmo ejemplar que es apropiado para determinar el porciento de identidad de secuencia y similaridad de secuencia es el algoritmo BLAST, que es descrito en Altschul et al, J. MoI. Biol. 215:403-410 (1990). Elementos de programación para efectuar análisis de BLAST están disponibles públicamente por medio del National Center for Biotechnology Information (en la dirección de web www.ncbi.nlm.nih.gov). Este algoritmo involucra identificar primero pares de secuencia de alta puntuación (HSPs) al identificar palabras cortas de

longitud W en la secuencia de interrogación, que ya sea coincide o satisface alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando son alineadas con una palabra de la misma longitud en la misma secuencia de base de datos. T es denominado como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al, supra.). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contienen. Los aciertos de palabras son extendidos en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por tanto como la puntuación de alineación acumulativa pueda ser incrementada. Las puntuaciones acumulativas son calculadas utilizando para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación hacia atrás para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalidad para residuos que no coinciden; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección son detenidas cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae por la cantidad X de su valor obtenido máximo; la puntuación acumulativa va a cero o menor debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuo de puntuación negativos o se llega ya sea a uno u otro del final de la secuencia. Para identificar si un ácido nucleico o polipéptido está dentro del alcance de la invención, los parámetros predeterminados de los programas de BLAST son

apropiados. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como predeterminado una longitud de palabra (W) del 3, una esperanza (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62. El programa TBLATN (utilizando secuencia de proteínas para secuencias de nucleótidos) utiliza como predeterminado una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10, y una matriz de puntuación BLOSUM 62.(véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. ScL USA 89:10915 (1989)).

Además de calcular el porciento de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también efectúa un análisis estadístico de la similaridad entre dos secuencias (por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similaridad provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se puede presentar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por probabilidad. Por ejemplo, un ácido nucleico es considerado similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0.1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0.01 y más

preferiblemente menos de aproximadamente 0.001.

II. GENERAL

La premisa de la invención está en parte en el concepto de que ciertos microorganismos pueden ser usados para producir aceites, combustibles y otras composiciones de hidrocarburos o lípidos económicamente y en grandes cantidades para uso en las industrias de combustible de transportación, industria petroquímica y/o de alimentos o cosméticos entre otras aplicaciones. Microorganismos apropiados incluyen microalgas, levadura oleaginosa y hongos. Un género preferido de microalgas para uso en la invención es la microalga que produce lípidos Chlorella. La transesterificación de lípidos produce ésteres de ácido graso de cadena larga útiles como biodiesel. Otros procesos enzimáticos y químicos pueden ser confeccionados para producir ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, alcanos y alquenos. La presente solicitud describe métodos para la modificación genética de múltiples especies y cepas de microorganismos, en los que se incluyen Chlorella y microbios similares para proveer organismos que tienen características que facilitan la producción de lípido apropiado para conversión a aceites, combustibles y oleoquímicos. En algunas aplicaciones, se producen diesel renovable, combustibles de jet u otros compuestos de hidrocarburos. La presente solicitud también describe métodos para cultivar microalgas para productividad incrementada y rendimiento de

lípido incrementado y/o para la producción más efectiva en el costo de las composiciones descritas en la presente.

En modalidades particulares, la presente solicitud describe cepas diseñadas genéticamente de microalgas con uno o más genes exógenos. Por ejemplo, microalgas que producen altos niveles de triacilglicéridos (TAG) apropiados para biodiesel pueden ser diseñados para expresar una lipasa, que puede facilitar la transesterificación de TAG de microalgas. La lipasa puede opcionalmente ser expresada utilizando un promotor inducible, de tal manera que las células pueden primero ser cultivadas a una densidad deseable en un fermentador y luego cosechadas, seguido por la inducción del promotor para expresar la lipasa, opcionalmente en presencia de alcohol suficiente para impulsar la conversión de TAG a ésteres de ácido graso.

Algo de lípido microalgal es secuestrado en las membranas celulares y otras partes no acuosas de la célula. Por consiguiente, para incrementar el rendimiento de la reacción de transesterificación, puede ser benéfico someter a lisis las células para incrementar el acceso de la lipasa al lípido. La disrupción celular puede ser efectuada, por ejemplo mecánicamente por medio de la adición de vapor presurizado o al emplear un virus que somete a lisis las células de microalgas, expresar un gen para producir una proteína lítica en la célula o tratar el cultivo con un agente que somete a lisis las células de microalgas. El tratamiento por vapor de microalgas

para disrupción celular es descrito por ejemplo en la Patente Estadounidense 6,750,048.

También se revela en la presente el diseño genético de microalgas que producen altos niveles de TAG para expresar un gen que somete a lisis células de microalgas, tales como por ejemplo, un gen de un virus lítico. Este gen puede ser expresado utilizando un promotor inducible, de tal manera que las células pueden primero ser cultivadas a una densidad deseable en un fermentador y luego cosechadas, seguido por inducción del promotor para expresar el gen para someter a lisis las células. Un gen que codifica una enzima poilsacárido-degradante, por ejemplo puede ser expresado para someter a lisis las células.

Opcionalmente, la lipasa puede ser expresada en un compartimiento intracelular, en donde permanece separada de la mayoría del lípido microalgal hasta la transesterificación. En general, es preferible llevar a cabo la transesterificación después que el agua ha sido sustancialmente removida de la preparación y/o se ha agregado un exceso de alcohol. Las lipasas pueden usar agua, también como alcohol, como sustrato en la transesterificación. Con agua, el lípido es conjugado a una porción de hidroxilo para producir un ácido graso polar, en lugar de un éster. Con un alcohol, tal como metanol, el lípido es conjugado a un grupo metilo, produciendo un éster de ácido graso no polar, que es comúnmente preferible para un

combustible de transportación. Para limitar la exposición de la lipasa al lípido microalgal hasta que las condiciones son apropiadas para la transesterificación para producir ésteres de ácido graso, la lipasa puede ser expresada, por ejemplo en el cloroplasto, mitocondria u otro organelo celular. Esta expresión por compartimientos da como resultado el secuestro de la lipasa de la mayoría del lípido celular hasta después que las células han sido sometidas a disrupción.

En otras modalidades particulares, la presente solicitud describe cepas diseñadas genéticamente de microalgas, levaduras oleaginosas, bacterias u hongos con uno o más genes exógenos para producir varios compuestos de hidrocarburo. Por ejemplo, microalgas que naturalmente o por medio de modificación genética, producirían altos niveles de lípidos pueden ser diseñadas (o diseñadas adicionamente) para expresar una acil-ACP tioesterasa, grasa exógena, que puede facilitar la escisión de ácidos grasos de la proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis del lípido. Estos ácidos grasos pueden ser recuperados o por medio de procesamiento enzimático adicional dentro de la célula, producir otros compuestos de hidrocarburo. Opcionalmente, la acil-ACP tioesterasa grasa puede ser expresada de un gen enlazado operativamente a un promotor inducible y/o puede ser expresada en un compartimiento intracelular.

La acil-ACP tioesterasa grasa puede ser escogida en

base a su especificidad por un ácido graso creciente (durante la síntesis de ácido graso) que tiene una longitud de cadena de carbono particular. Por ejemplo, la acil-ACP tioesterasa grasa puede tener una especificidad por una longitud de cadena de carbonos que fluctúa de 8 a 34 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 18 átomos de carbono y más preferiblemente de 10 a 14 átomos de carbono. Una especificidad por un ácido graso con 12 átomos de carbono es más preferida.

Además, la invención proporciona cepas diseñadas genéticamente de microalgas para expresar dos o más genes exógenos, tales como por ejemplo, una lipasa y un gen lítico, por ejemplo, uno que codifica una enzima polisacárido-degradante. Uno o ambos genes pueden ser expresados utilizando un promotor inducible, que permite la sincronización relativa de expresión de esos genes sea controlada para mejorar el rendimiento de lípido y conversión a ésteres de ácido graso. La invención también proporciona vectores y métodos para diseñar microbios que producen lípido para metabolizar sacarosa, que es un rasgo ventajoso debido a que permite que las células diseñadas conviertan la caña de azúcar u otras materias primas de alimentación en lípidos apropiados para la producción de aceites, combustibles, oleoquímicos y los semejantes.

En otras modalidades, la invención proporciona cepas diseñadas genéticamente de microbios (por ejemplo, microalgas, levadura oleaginosa, materias u hongos) que expresan dos o más

genes exógenos, tales como por ejemplo una acil-ACP tioesterasa grasa y una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, la acción combinada de lo cual produce un producto de alcohol. La invención proporciona además otras combinaciones de genes exógenos, en los que se incluyen sin limitación, una acil-ACP tioesterasa grasa y una proteína portadora de acilo co-expresada naturalmente para generar ácidos grasos de longitud específica o una acil-ACP tioesterasa grasa y una acil-CoA reductasa grasa para generar aldehídos. La invención también proporciona la combinación de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa y un aldehído descarbonilasa grasa para generar alcanos o alquenos. Uno o más de los genes exógenos pueden ser expresados utilizando un promoter inducible.

La invención proporciona modificaciones adicionales de microalgas, por ejemplo para proveer microalgas con características de crecimiento deseadas y/o para mejorar la cantidad y/o calidad de lípidos producidos. Por ejemplo, las microalgas pueden ser diseñadas para incrementar el flujo de carbono a la ruta del lípido y/o modificar la ruta del lípido para alterar benéficamente las proporciones o propiedades del lípido producido por las células.

La presente solicitud revela cepas diseñadas genéticamente de microalgas para expresar dos o más genes exógenos, uno que codifica un transportador de una fuente de

carbono fija (tal como sacarosa) y un segundo que codifica una enzima de invertasa sacarosa. Los organismos fermentables resultantes producen hidrocarburos a un costo de manufactura más bajo que aquél que ha sido obtenible mediante métodos previamente conocidos de producción de hidrocarburos biológicos. La inserción de los dos genes exógenos descritos anteriormente puede ser combinada con la disrupción de la biosíntesis del polisacárido por medio de mutagénesis dirigida y/o aleatoria, que dirige un flujo de carbono aun mayor a la producción de hidrocarburo. Individualmente y en combinación, la conversión trópica, diseño para alterar la producción de hidrocarburo y tratamiento con enzimas exógenas alteran la composición de hidrocarburo producida por un organismo. La alteración puede ser un cambio en la cantidad de hidrocarburos producidos, la cantidad de una o más especies de hidrocarburos producidas en relación con otros hidrocarburos y/o los tipos de especies de hidrocarburos producidos en el microorganismo. Por ejemplo, microalgas pueden ser diseñadas para producir una cantidad y/o porcentaje más alto de TAG.

III. MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN ACEITE O LÍPIDO

Se puede usar cualquier especie de organismo que produce lípido o hidrocarburo apropiado, aunque los microorganismos que producen naturalmente altos niveles de lípido o hidrocarburo apropiados son preferidos. La producción

de hidrocarburos por microorganismos es revisada por Metzger et al. Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66: 486-496 y A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel of Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann y Paul Roessler (1998).

Consideraciones que afectan la selección de microorganismos para uso en la invención incluyen, además de la producción de lípidos o hidrocarburos apropiados para la producción de aceites, combustibles y oleoquímicos: (1) alto contenido de lípido como porcentaje de peso de célula; (2) facilidad de cultivo; (3) facilidad de diseño genético; y (4) facilidad de procesamiento de biomasa. En modalidades particulares, el microorganismo tipo silvestre o diseñado genéticamente produce células que son por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65% o por lo menos 70% o más de lípido. Organismos preferidos crecen heterotróficamente (sobre azúcares en la ausencia luz) o puede ser diseñado para hacer esto utilizando, por ejemplo, los métodos revelados en la presente. La facilidad de transformación y disponibilidad de marcadores y promotores seleccionables, constitutivos y/o inducibles, que son funcionales en el microorganismo afectan la facilidad del diseño genético. Consideraciones de procesamiento pueden incluir, por ejemplo, la disponibilidad de medios efectivos para someter a lisis las células.

A. <u>Algas</u>

En una modalidad de la presente invención, el microorganismo es una microalga. Ejemplos no limitantes de microalgas que pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de microalgas

Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Bracteococcus minor, Bracteococcus medionucleatus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora (cepa SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis,

Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella ovalis, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (en las que se incluyen cualquiera de las cepas UTEX 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. Ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta,

Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEXLB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp., Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, Parachlorella kessleri, Pascheria acidophila, Pavlova sp., Phagus, Phormidium, Platymonas sp., Pleurochrysis carterae, Pleurochrysis dentate, Pleurochrysis sp., Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis, Prototheca zopfii, Pseudochlorella aquatica, Pyramimonas sp., Pyrobotrys, Rhodococcus opacus, Sarcinoid chrysophyte, Scenedesmus armatus, Schizochytrium, Spirogyra, Spirulina platensis, Stichococcus sp., Synechococcus

sp., Tetraedron, Tetraselmis sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii y Viridiella fridericiana

1. *Chlorella*

En una modalidad preferida de la presente invención, el microorganismo es del género *Chlorella*, Preferiblemente, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella minutissima* o *Chlorella emersonii*.

Chlorella es un género de alga verde de una sola célula, perteneciente al filo Chlorophyta. Es de forma esférica, de aproximadamente 2 a 10 µm de diámetro y está sin flagelos. Algunas especies de *Chlorella* son naturalmente heterotróficas.

Chlorella, particularmente *Chlorella protothecoides*, es un microorganismo preferido para uso en la invención debido de su alta composición de lípido, particularmente lípido de cadena larga apropiado para biodiesel. Además, esta microalga crece heterotróficamente y puede ser diseñada genéticamente como se demuestra en los ejemplos en la presente.

En una modalidad preferida de la presente invención, el microorganismo usado para la expresión de un transgen es del género *Chlorella*, preferiblemente, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima* o *Chlorella emersonii*. Ejemplos de expresión de transgenes en, por ejemplo, *Chlorella*, se pueden encontrar en la literatura (véase por ejemplo Current

Microbiology Vol. 35 (1997), pp. 356-362; Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2000 Jul; 16(4):443-6; *Current Microbiology* Vol. 38 (1999), pp. 335-341; *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 72: 197-205; *Marine Biotechnology* 4, 63-73, 2002; *Current Genetics* 39:5, 365-370 (2001); *Plant Cell Reports* 18:9, 778-780, (1999); *Biologia Plantarium* 42(2): 209-216, (1999); *Plant Pathol*. J 21(1): 13-20, (2005)). También véanse Ejemplos en la presente. Otras microalgas que producen lípidos pueden ser diseñadas también, en las que se incluyen microalgas procariónticas (véase Kalscheuer st al., Applied Microbiology and Biotechnology, Volumen 52, Número 4 / Octubre, 1999).

2. Identificación de Especie de *Chlorella*

Las especies de *Chlorella* para uso en la invención pueden ser identificadas mediante amplificación de ciertas regiones objetivo del genoma. Por ejemplo, la identificación de una especie o cepa de *Chlorella* específica puede ser obtenida por medio de amplificación y secuenciación de ADN nuclear y/o de cloroplasto utilizando cebadores y metodología utilizando cualquier región del genoma, por ejemplo utilizando los métodos descritos en Wu et al., *Bot. Bull. Acad. Sin*. (2001) 42:115-121 Identificación de aislados de *Chlorella spp* utilizando secuencias de ADN ribosomales. Métodos bien establecidos de análisis filogenético, tales como amplificación y secuenciación de separador transcrito interno ribosomal (ITS1 y ITS2 rDNA),

18S rRNA y otras regiones genómicas conservadas pueden ser usadas por aquellos experimentados en el arte para identificar especies no solamente de *Chlorella*, sino otros organismos que producen hidrocarburos y lípidos aptos de usar los métodos revelados en la presente. Para ejemplos de métodos de identificación y clasificación de algas véase también por ejemplo Genetics, Agosto 2005; 170(4):1601-10 y RNA, Abril 2005; 11(4):361-4.

B. Levadura Oleaginosa

En una modalidad de la presente invención, el microorganismo es una levadura oleaginosa. Ejemplos no limitantes de levadura oleaginosa que puede ser usada de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en la Tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de levadura oleaginosa.

Cryptococcus curvatus, *Cryptococcus terricolus*, *Candida sp.*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer*, *Endomycopsis vernalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis* y *Yarrowia lipolytica*

C. Otros Hongos

En una modalidad de la presente invención, el microorganismo es un hongo. Ejemplos no limitantes de hongos

que pueden ser usados de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en la Tabla 3.

Tabla 3. Ejemplos de hongos

Mortierella, *Mortierrla vinacea*, *Mortierella alpine*, *Pythium debaryanum*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Pennicillium iilacinum*, *Hensenulo*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Rhizopus y Pythium*

D. Bacterias

En una modalidad de la presente invención, el microorganismo es una bacteria.

Ejemplos de expresión de genes exógenos en bacterias, tales como *E. coli*, son bien conocidos; véase por ejemplo *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al. (3ª edición, 2001, Cold Spring Harbor Press).

IV. MÉTODOS DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos son cultivados tanto por propósitos de llevar a cabo manipulaciones genéticas y para producción subsecuente de hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos). El primer tipo de cultivo se lleva a cabo a pequeña escala e inicialmente, por lo menos, bajo condiciones en las cuales el microorganismo de partida puede crecer. Por ejemplo, si el microorganismo de

partida es un fotoautótrofo el cultivo inicial se lleva a cabo en presencia de luz. Las condiciones de cultivo pueden ser cambiadas si el microorganismo es desarrollado o diseñado para crecer independientemente de luz. El cultivo por propósitos de producción de hidrocarburos se lleva a cabo usualmente a gran escala. Preferiblemente una fuente de carbono fija está presente. El cultivo puede también ser expuesto a la luz algo o todo el tiempo.

Las microalgas pueden ser cultivadas en medios líquidos. El cultivo puede estar contenido dentro de un bioreactor. Opcionalmente, el bioreactor no permite que la luz entre. Alternativamente, las microalgas pueden también ser cultivadas en fotobioreactores que contienen una fuente de carbono fija y permitir que la luz choque con las células. La exposición de las células de microalgas a la luz, aun en presencia de una fuente de carbono fija que las células transportan y utilizan (esto es, crecimiento mixotrófico), acelera no obstante el crecimiento en comparación con el cultivo de las células en la oscuridad. Los parámetros de condiciones de cultivo pueden ser manipulados para optimizar la producción total de hidrocarburos, la combinación de especies de hidrocarburos producidas y/o producción de una especie de hidrocarburo. En algunas instancias es preferible cultivar células en la oscuridad, tal como por ejemplo cuando se usan fermentadores extremadamente grandes (de 40,000 litros y más)

que no permiten que la luz choque con el cultivo.

Los medios de cultivo de microalgas contienen comúnmente componentes tales como una fuente de nitrógeno fija, elementos en trazas, opcionalmente una solución reguladora del pH para el mantenimiento de pH y fosfato. Otros componentes pueden incluir una fuente de carbono fija tal como acetato o glucosa y sales tales como cloruro de sodio, particularmente para microalgas de agua de mar. Ejemplos de elementos en trazas incluyen zinc, boro, cobalto, cobre, manganeso y molibdeno en por ejemplo, las formas respectivas de $ZnCl_2$, H_3BO_3, $CoCl_2 \bullet 6OH_2O$, $CuCl_2 \bullet 2H_2O$, $MnCl_2 \bullet 4H_2O$ y $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \bullet 4H_2O$.

Para organismos aptos de crecer sobre una fuente de carbono fija, la fuente de carbono fija puede ser, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, xilosa, manosa, rhamnosa, N-acetilglucosamina, glicerol, floridosida y/o ácido glucurónico. La una o más fuentes de carbono pueden ser suministradas a una concentración de aproximadamente 50 µM, por lo menos aproximadamente 100 µM, por lo menos aproximadamente 500 µM, por lo menos aproximadamente 5 mM, por lo menos aproximadamente 50 mM y por lo menos aproximadamente 500 mM, de una o más fuentes de carbono fijas provistas exógenamente. Algunas especies de microalgas pueden ser cultivadas al utilizar una fuente de carbono fija tal como glucosa o acetato en ausencia de luz. Tal cultivo es conocido como cultivo heterotrófico. Para *Chlorella protothecoides*, por ejemplo, el

crecimiento heterotrófico da como resultado alta producción de biomasa y acumulación de alto contenido de lípido en las células.

Algunos microorganismos crecen naturalmente sobre o pueden ser diseñados para crecer sobre una fuente de carbono fija que es una fuente heterogénea de compuestos tales como desperdicio municipal, aguas cloacales tratadas secundariamente, agua de desperdicio y otras fuentes de carbono fijo y otros nutrientes tales como sulfatos, fosfatos y nitratos. El componente de aguas cloacales sirve como fuente de nutriente en la producción de hidrocarburos y el cultivo proporciona una fuente no cara de hidrocarburos.

Otros parámetros de cultivo pueden también ser manipulados, tales como el pH del medio de cultivo, la identidad y concentración de elementos en trazas y otros constituyentes del medio.

A. <u>Crecimiento Fotosintético</u>

Las microalgas pueden ser cultivadas en presencia de luz. El número de fotones que chocan con un cultivo de células de microalgas puede ser manipulado, también como otros parámetros tales como el espectro de longitud de onda y proporción de horas de oscuridad:luz por día. Las microalgas pueden también ser cultivadas en luz natural, también como combinaciones simultáneas y/o alternantes de luz natural y luz

artificial. Por ejemplo, las microalgas del género *Chlorella* pueden ser cultivadas bajo luz natural durante horas del día y bajo luz artificial durante horas de la noche.

El contenido de gas de un fotobioreactor para cultivar microorganismos como microalgas puede ser manipulado. Parte del volumen de un fotobioreactor puede contener gas en lugar de líquido. Se pueden usar entradas de gas para bombear gases al fotobioreactor. Se puede bombear cualquier gas a un fotobioreactor, en los que se incluyen aire, mezclas de aire/CO_2, gases nobles tales como argón y otros. La velocidad de entrada de gas a un fotobioreactor puede también ser manipulada. El incrementar el flujo de gas a un fotobioreactor incrementa la turbidez de un cultivo de microalgas. La colocación de compuertas que transportan gases a un fotobioreactor puede también afectar la turbidez de un cultivo a una velocidad de flujo de gas dada. Las mezclas de aire/CO_2 pueden ser moduladas para generar cantidades óptimas de CO_2 para el crecimiento máximo por un organismo particular. Las microalgas crecen significativamente más rápido en la luz bajo, por ejemplo 3% de CO_2/97% de aire que en 100% de aire. 3% de CO_2/97% de aire es aproximadamente 100 veces más CO_2 que el encontrado en el aire. Por ejemplo, las mezclas de aire:CO_2 de aproximadamente 99.75% de aire:0.25% de CO_2, aproximadamente 99.5% de aire:0.5% de CO_2, aproximadamente 99.0% de aire: 1.00% de CO_2, aproximadamente 98.0% de aire:2.0% de CO_2,

aproximadamente 97.0% de aire:3.0% de CO_2, aproximadamente 96.0% de aire:4.0% de CO_2, y aproximadamente 95.00% de aire:5.0% de CO_2 pueden ser infusionadas a un bioreactor o fotobioreactor.

Los cultivos de microalgas pueden también ser sometidos a mezcla utilizando dispositivos tales como hojas e impulsores de centrifugación, sacudimiento de un cultivo, barras de agitación, infusión de gas presurizado y otros instrumentos.

Los fotobioreactores pueden tener entradas que permiten entrada de gases, sólidos, semisólidos y líquidos a la cámara que contiene las microalgas. Las compuertas son anexadas usualmente a tubería u otros medios para transportar sustancias. Las compuertas de gas, por ejemplo, transportan gases al cultivo. El bombeo de gases a un fotobioreactor puede servir tanto para alimentar las células CO_2 y otros gases y para airear el cultivo y por consiguiente generar turbidez. La cantidad de turbidez de un cultivo varía a medida que el número y posición de compuertas de gases es alterado. Por ejemplo, las compuertas de gas pueden ser colocadas a lo largo del fondo de una bolsa de polietileno cilíndrica. Las microalgas crecen más rápido cuando se agrega CO_2 al aire y es bombeado a un fotobioreactor. Por ejemplo, se realiza una infusión de una mezcla de aire de 5% de CO_2:95% de aire a un fotobioreactor que contiene células de *Botryococcus* (véase por ejemplo J Agric

Food Chem. 2006 Jun 28; 54(13):4593-9; J Biosci Bioeng. 1999; 87(6):811-5; y J Nat Prod. 2003 Jun; 66(6):772-8).

Los fotobioreactores pueden ser expuestos a una o más fuentes de luz para proveer a las microalgas con luz como fuente de energía vía la luz dirigida a la superficie del fotobioreactor. Preferiblemente, la fuente de luz proporciona una intensidad que es suficiente para que las células crezcan, pero no tan intensa para provocar daños oxidante o provocar una respuesta fotoinhibidora. En algunas instancias, una fuente de luz tiene un intervalo de longitud de onda que imita o imita aproximadamente el intervalo del sol. En otras instancias, se usa un intervalo de longitud de onda diferente. Los fotobioreactores pueden ser colocados a la intemperie o en un invernadero u otro equipo que permite que la luz del sol llegue a la superficie. Las intensidades de fotones preferidas para especies del *Botryococcus* son de entre 25 y 500 µE m^{-2} s^{-1} (véase por ejemplo Fotosynth Res. 2005 Jun; 84(1-3):21-7).

Los fotobioreactores tienen preferiblemente una o más compuertas que permiten la entrada de medios. No es necesario que solamente una sustancia entre o salga de una compuerta. Por ejemplo, se puede usar una compuerta para hacer fluir medios de cultivo al fotobioreactor y luego más tarde ser usada para la toma de muestras, entrada de gas, salida de gas u otros propósitos. En algunas instancias, un fotobioreactor es llenado con medios de cultivo al comienzo de un cultivo y ya no se hace

la infusión de más medios de cultivo después que el cultivo es inoculado. En otras palabras, la biomasa de microalgas es cultivada en un medio acuoso por un período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en número; sin embargo, cantidades de medio de cultivo acuoso no se hacen fluir a través del fotobioreactor en todo el período de tiempo. Así, en algunas modalidades, el medio de cultivo acuoso no se hace fluir a través del fotobioreactor después de la inoculación.

En otras instancias, el medio de cultivo se puede hacer fluir a través del fotobioreactor en todo el período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en número. En algunas modalidades, se hace la infusión del medio al fotobioreactor después de la inoculación pero antes de que las células llegan a una densidad deseada. En otras palabras, un régimen de flujo turbulento de entrada de gas y entrada de medios no es mantenido para reproducción de microalgas hasta que se ha obtenido un incremento deseado en el número de las microalgas.

Los fotobioreactores tienen preferiblemente una o más compuertas que permiten la entrada de gas. El gas puede servir tanto para proporcionar nutrientes tales como CO_2, también como para proveer turbulencia en el medio de cultivo. La turbulencia puede ser obtenida al colocar una compuerta de entrada de gas debajo del nivel del medio de cultivo acuoso, de tal manera que

el gas que entra al fotobioreactor burbujea a la superficie del cultivo. Una o más compuertas de salida de gas permite que el gas escape, impidiendo mediante esto la acumulación de presión en el fotobioreactor. Preferiblemente una compuerta de salida de gas conduce a una válvula "unidireccional" que impide que microorganismos contaminantes entren al fotobioreactor. En algunas instancias, las células son cultivadas en un fotobioreactor por un período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en número, sin embargo, un régimen de flujo turbulento con remolinos turbulentos predominantemente en todo el medio de cultivo provocan que la entrada de gas no sea mantenida por todo el período de tiempo. En otras instancias, un régimen de flujo turbulento con remolinos turbulentos predominantemente en todo el medio de cultivo provocado por la entrada de gas puede ser mantenido por todo el período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en un número. En algunas instancias, un intervalo predeterminado de proporciones entre la escala del fotobioreactor y la escala de remolinos no es mantenido por el período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen e incrementan en número. En otras instancias, tal intervalo puede ser mantenido.

Los fotobioreactores tienen preferiblemente por lo menos una compuerta que puede ser usada para la toma de muestras del cultivo.

Preferiblemente, una compuerta de toma de muestras puede ser usada repetidamente sin alterar o comprometer la naturaleza axénica del cultivo. Una compuerta de toma de muestras puede ser configurada con una válvula u otro dispositivo que permite que el flujo de la muestra sea detenido e iniciado. Alternativamente una compuerta de toma de muestras puede permitir la toma de muestras continua. Los fotobioreactores tienen preferiblemente por lo menos una compuerta que permite la inoculación de un cultivo. Tal compuerta puede también ser usada para otros propósitos tales como entrada de medios o entrada de gas.

B. <u>Cultivo heterotrófico</u>

Como una alternativa al crecimiento fotosintético de microorganismos, como se describe anteriormente, algunos microorganismos pueden ser cultivados bajo condiciones de cultivo heterotróficas en las cuales una fuente de carbono fija proporciona energía para el crecimiento y acumulación de lípido.

En un método de cultivo heterotrófico de acuerdo con la invención, el costo de la producción de biodiesel, glicerol crudo, parcialmente purificado o purificado producido como producto secundario de la transesterificación de lípido puede ser empleado como materia prima de alimentación para la fermentación, por ejemplo de cultivos microbianos que producen

lípido. Así, la invención abarca cultivar un microbio (por ejemplo, una microalga) en un primer medio de cultivo; recuperar el lípido microbiano del cultivo; someter el lípido microbiano a transesterificación para producir éster(es) de ácido graso y glicerol, como se describe anteriormente; y agregar el glicerol a un segundo cultivo microbiano como materia prima de alimentación. Los primeros y segundos cultivos microbianos pueden ser pero no necesitan ser cultivos del mismo microbio. Si se desea, se puede idear un sistema continuo mediante el cual el glicerol producido del lípido recuperado de un cultivo puede ser alimentado de regreso al mismo cultivo.

La invención proporciona parámetros de cultivo significativamente mejorados que incorporan el uso de glicerol para la fermentación de múltiples géneros tanto de microbios eucariónticos como procariónticos, en los que se incluyen microbios de los géneros *Chlorella*, *Navicula*, *Scenedesmus* y *Spirulina*. Como los ejemplos lo demuestran, microbios de linajes de evaluación extremadamente divergentes, en los que se incluyen *Chlorella*, *Navicula*, *Scenedesmus* y *Spirulina* también como cultivos de múltiples especies de *Chlorella* distintas y cepas crecen muy bien sobre no solamente glicerol grado reactivo purificado, sino también sobre un producto secundario de glicerol acidulado y sin acidular de la transesterificación de biodiesel, en algunas instancias, microalgas, tales como cepas de *Chlorella*, sufren división celular más rápido en

presencia de glicerol que en presencia de glucosa. En estas instancias, procesos de cultivo de dos etapas en los cuales las células son primero alimentadas con glicerol para incrementar rápidamente la densidad calor y son luego alimentadas con glucosa para acumular lípidos pueden mejorar la eficiencia con la cual los lípidos son producidos. El uso del producto secundario de glicerol del proceso de transesterificación proporciona ventajas económicas significativas cuanto es puesta de regreso al proceso de producción. Otros métodos de alimentación son provistos también, tales como mezclas de glicerol y glucosa. La alimentación de tales mezclas también captura los mismos beneficios económicos. Además, la invención proporciona métodos de alimentación de azúcares alternativos a microalgas tales como sacarosa en varias combinaciones con glicerol. Estos beneficios provistos por la invención han sido demostrados en la presente en microbios de linajes de evolución extremadamente divergentes, en los que se incluyen tanto procariontes como eucariontes, demostrando la utilidad de la invención para la fermentación microbiana.

Métodos estándar para el cultivo y propagación de *Chlorella protothecoides* son conocidos (véase por ejemplo Miao y Wu, *J. Biotechnology*, 2004, 11: 85-93 y Miao y Wu, *Biosource Technology* (2006) 97:841-846). La invención también proporciona nuevas condiciones de cultivo para *Chlorella*. Por ejemplo, múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una

especie pueden ser cultivadas en presencia de glicerol, en los que se incluyen productos secundarios de glicerol de la transesterificación de biodiesel.

Para la producción de hidrocarburos, células, en las que se incluyen células recombinantes de la invención descritas en la presente, son preferiblemente cultivadas o fermentadas en grandes cantidades. El cultivo puede ser en volúmenes grandes de líquido, tales como en cultivo de suspensión como ejemplo. Otros ejemplos incluyen iniciar con un pequeño cultivo de células que se expanden a una biomasa grande en combinación con cultivo celular y propagación también como producción de hidrocarburo. Bioreactores o fermentadores de acero pueden ser usados para acomodar grandes volúmenes de cultivo. Un fermentador similar a aquellos usados en la producción de cerveza y/o vino es apropiado, como lo son fermentadores extremadamente grandes usados en la producción de etanol.

Se proporcionan fuentes de nutrientes apropiadas para el cultivo en un fermentador. Estos incluyen materias primas tales como una o más de los siguientes: una fuente de carbono fija tal como glucosa, almidón de maíz, material celulósico despolimerizado, sacarosa, caña de azúcar, remolacha de azúcar, lactosa, suero de leche o melasas; una fuente de grasas, tales como grasas o aceites vegetales; una fuente de nitrógeno, tal como proteína, harina de soya, licor de maíz, amoníaco (puro o en forma de sal), nitrato o sal de nitrato o nitrógeno

molecular; y una fuente de fósforo, tales como sales de fosfato. Adicionalmente, un fermentador permite el control de las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH, tensión de oxígeno y niveles de dióxido de carbono. Opcionalmente, componentes gaseosos, como oxígeno o nitrógeno, pueden ser burbujeados a través de un cultivo líquido. Otras fuentes de almidón (glucosa) tales como trigo, patata, arroz y sorgo. Otras fuentes de carbono incluyen corrientes de proceso tales como glicerol grado técnico, lico negro, ácidos orgánicos tales como acetato y melasas. Fuentes de carbono pueden también ser provistas como una mezcla, tal como una mezcla de sacarosa y pulpa de remolacha de azúcar despolimerizada.

Se puede usar un fermentador para permitir que las células sufran las varias fases de su ciclo de crecimiento. Como un ejemplo, se puede introducir un inóculo de células que producen hidrocarburos a un medio seguido por un período de retardo (fase de retardo) antes que las células comiencen a crecer. Enseguida del período de retardo, la velocidad de crecimiento se incrementa de manera estable y entra a la fase logarítmica o exponencial. La fase exponencial es su vez seguida por un frenado del crecimiento debido a disminuciones en nutrientes y/o incrementos en sustancias tóxicas. Después de este frenado, el crecimiento se detiene y las células entran a una fase estacionaria o estado estable, dependiendo del medio ambiente particular provisto a las células.

La producción de hidrocarburos por las células reveladas en la presente puede ocurrir durante la fase logarítmica o después de esta, incluyendo la fase estacionaria en donde los nutrientes son suministrados o están todavía disponibles, para permitir la continuación de la producción de hidrógeno en ausencia de división celular.

Preferiblemente, los microorganismos cultivados utilizando las condiciones descritas en la presente y conocidas en el arte comprenden por lo menos aproximadamente 20% en peso de lípido, preferiblemente por lo menos aproximadamente 40% de en peso, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 50% de en peso y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 60% de en peso.

Un descubrimiento sorprendente es que múltiples especies y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella* se desempeñan mejor en presencia del producto secundario de glicerol de la transesterificación que en una cantidad equivalente de glicerol grado reactivo. El producto secundario de glicerol de la transesterificación contiene usualmente metanol residual y otros contaminantes además de glicerol. Por ejemplo, las Figuras 1-6 demuestran que las cepas de *Chlorella protothecoides* y *Chlorella kessleri* exhiben mejor productividad sobre el producto secundario de glicerol acidulado y sin acidular de reacciones de transesterificación de lípido que cuando crecen sobre glicerol grado reactivo puro. Otros

microbios, tales como *Scenedesmus* y microalgas de *Navicula* pueden también funcionar mejor en presencia del producto secundario de glicerol de la transesterificación que una cantidad equivalente de glicerol grado reactivo.

Peso seco de célula por litro: La Figura 1 demuestra que el peso seco de célula fue más alto sobre el producto secundario de glicerol de biodiesel que sobre glicerol puro y esta tendencia se mantuvo cierta cuando las células fueron cultivadas en glicerol por sí mismo o en combinación con glucosa. La Figura 2 muestra las mismas tendencias con cepas adicionales de *Chlorella*. La Figura 12(b) demuestra que el peso seco de célula por litro de *Scenedesmus armatus* es más alto sobre el glicerol de producto secundario de biodiesel acidulado y sin acidular que sobre glicerol grado reactivo puro. La Figura 13 demuestra que el peso seco de célula por litro de *Navicula pelliculosa* es más alto sobre el glicerol de producto secundario de biodiesel sin acidular que sobre el glicerol grado reactivo puro.

Contenido de lípido por litro: Las figuras 3 y 4 demuestran que múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella*, niveles de lípido por litro son más altos cuando las células son cultivadas en presencia de producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son cultivadas en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro.

Lípido como un porcentaje de peso celular: La Figura 5 y 6 demuestran que múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella* acumulan un porcentaje más alto de peso seco de células como lípido cuando son cultivadas en presencia del producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son cultivadas en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro. La Figura 11 demuestra que tanto *Spirulina platensis* y *Navicula pelliculosa* pueden acumular un porcentaje más alto de peso seco de célula como lípido cuando son cultivadas en presencia de producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son cultivadas en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro. La Figura 12(a) demuestra que *Scenedesmus armatus* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de célula como lípido cuando son cultivadas en presencia del producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son cultivadas en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro.

Otro resultado sorprendente es que múltiples especies de microbios, en los que se incluyen microalgas tales como *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella* y otras microalgas tales como *Scenedesmus*, *Navicula* y *Spirulina* exhiben mejores características como productores de biodiesel en presencia de mezclas de glicerol y glucosa que en presencia de solamente glucosa.

Contenido de lípido por litro: La Figura 7 demuestra que *Chlorella* puede acumular niveles más altos de lípido por litro de cultivo en presencia de 1% de glicerol/1% de glucosa que en presencia de 2% de glucosa.

Lípido como porcentaje de peso de célula: La Figura 8 demuestra que *Chlorella* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de células como lípido cuando es cultivada en presencia de una mezcla de igual concentración (por ciento en peso) de glicerol y glucosa que cuando es cultivada en presencia de solamente glucosa. La Figura 11(a) demuestra que *Spirulina platensis* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de célula como lípido cuando es cultivada en presencia de una mezcla de igual concentración (por ciento en peso) de glicerol producto secundario de biodiesel y glucosa que cuando es cultivada en presencia de solamente glucosa. La Figura 11(b) demuestra que *Navicula pelliculosa* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de células como lípido cuando es cultivada en presencia de una mezcla de igual concentración (por ciento en peso) de glicerol grado reactivo y glucosa, también como glicerol producto secundario de biodiesel y glucosa, que cuando es cultivada en presencia de solamente glucosa. La Figura 12(b) demuestra que *Scenedesmus armatus* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de células como lípido cuando es cultivada en presencia de igual concentración (por ciento en peso) de glicerol producto

secundario de biodiesel y glucosa que cuando es cultivada en presencia de solamente glucosa.

Un descubrimiento adicional e inesperado es que la adición de glicerol y glucosa al microbio, en los que se incluyen microalgas tales como *Chlorella, Scenedesmus* y *Navicula* secuencialmente en lugar de que como una sola mezcla lote de glicerol y glucosa puede generar ganancias de rendimiento adicionales. Este atributo de múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie de *Chlorella* fue probado en presencia tanto del producto secundario de glicerol de biodiesel como de glicerol grado reactivo.

Lípido como porcentaje de peso de célula: La Figura 8 demuestra que *Chlorella* puede acumular un porcentaje más alto de peso seco de célula como lípido cuando se agrega glicerol a un cultivo por un primer período de tiempo, seguido por la adición de glucosa y cultivo proseguido por un segundo período de tiempo, que cuando las mismas cantidades de glicerol y glucosa son agregadas conjuntamente al comienzo del experimento.

Contenido de lípido por litro: La Figura 9 muestra que *Chlorella* que exhibe niveles más altos de lípido por litro de cultivo cuando glicerol y glucosa son agregados secuencialmente que cuando las mismas cantidades de glicerol y glucosa son agregadas conjuntamente al comienzo del experimento. Esta tendencia fue observada cuando el glicerol

producto secundario de biodiesel acidulado, glicerol producto secundario de biodiesel sin acidular o glicerol grado reactivo fue utilizado.

Peso seco de célula por litro: La Figura 10 demuestra cuatro cepas diferentes de *Chlorella* de dos especies diferentes que acumulan un peso seco de células más alto por litro de cultivo cuando glicerol y glucosa son agregados secuencialmente que cuando las mismas cantidades de glicerol y glucosa son agregadas conjuntamente al comienzo del experimento. Esta tendencia fue observada cuando el glicerol producto secundario de biodiesel acidulado, glicerol producto secundario de biodiesel sin acidular o glicerol grado reactivo fue utilizado. Las Figuras 14(a) y (b) demuestran que tanto *Scenedesmus armatus* y *Navicula pelliculosa* pueden exhibir incrementos en peso seco de célula por litro cuando el glicerol producto secundario de biodiesel solamente es agregado a un cultivo por un primer período de tiempo, seguido más tarde por la adición de glucosa, en comparación con la adición de cantidades idénticas de glicerol y glucosa al comienzo de la fermentación.

Tres diferentes marcadores de productividad (peso seco de célula por litro, gramos por litro de lípidos y porcentaje de peso seco de células como lípido) en la producción de lípido microbiana son mejorados mediante el uso del producto secundario de biodiesel y separación temporal de fuentes de carbono. La invención por consiguiente proporciona

nuevos métodos para generar cantidades más altas de lípido por tiempo unitario en múltiples especies de microbios a partir de áreas altamente divergentes del árbol evolutivo, en los que se incluyen tanto procariontes como eucariontes. Los métodos para manufactura de lípidos e hidrocarburos revelados en la presente utilizando glicerol no están limitados a microalgas, si no que pueden ser usados con cualquier microbio capaz de utilizar glicerol como fuente de energía.

En un método de crecimiento heterotrófico alternativo de acuerdo con la presente invención, los microorganismos pueden ser cultivados utilizando biomasa celulósica despolimerizada como materia prima de alimentación. La biomasa celulósica (por ejemplo, rastrojo, tal como rastrojo de maíz) es no cara y está fácilmente disponible; sin embargo, los intentos para usar este material como materia prima de alimentación por levadura han fracasado. En particular, se ha encontrado que tal materia prima de alimentación es inhibidora al crecimiento de levadura y la levadura no puede usar los azúcares de cinco carbonos producidos a partir de materiales celulósicos (por ejemplo, xilosa de hemicelulosa). En contraste, las microalgas pueden crecer sobre material celulósico procesado. Así, la invención proporciona un método para cultivar microalgas en presencia de un material celulósico y/o un azúcar de cinco átomos de carbono. Los materiales celulósicos incluyen en general:

Componente	**Por ciento en peso seco**
Celulosa	40-60%
Hemicelulosa	20-40%
Lignina	10-30%

Componente	Por ciento peso seco
Celulosa	40-60%
Hemicelulosa	20-40%
Lignina	10-30%

Materiales celulósicos apropiados incluyen residuos de cosechas de energía herbácea y cosechas de energía de madera, también como cosechas agrícolas, esto es, las partes de plantas, principalmente tallos y hojas, no removidos de los campos del producto alimenticio o de fibra primarios. Ejemplos incluyen desperdicios agrícolas tales como bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, fibra de maíz (que incluyen tallos, hojas, cáscaras y mazorcas), paja de trigo, paja de arroz, pulpa de chocolate de azúcar, pulpa cítrica, cáscaras cítricas; desperdicios forestales tales como madera dura y adelgazamiento de madera blanda y residuos de madera dura y madera blanda de operaciones de maderanes; desperdicios de madera tales como desperdicios de molino de tierra (virutas de madera, polvo de madera) y desperdicio de molino de pulpa; residuos urbanos tales como fracciones de papel de residuos sólidos municipales; residuos de madera urbana y residuos orgánicos urbanos tales

como fragmentos de césped municipal y residuos de construcción con madera. Celulósicos adicionales incluyen cosechas celulósicas dedicadas tales como pasto varilla, madera de álamo híbrido y miscanto, caña de azúcar y fibra de sorgo. Los azúcares de cinco átomos de carbono que son producidos a partir de tales materiales incluyen xilosa.

Sorprendentemente, se ha demostrado en la presente que algunas especies de *Chlorella* exhiben niveles más altos de productividad cuando son cultivados en una combinación de glucosa y xilosa que cuando son cultivados ya sea sobre glucosa o xilosa solos. Este efecto sinergístico proporciona una ventaja significativa en que permite el cultivo de *Chlorella* sobre combinaciones de xilosa y glucosa, tal como material celulósico y se muestran en la Figura 15.

En todavía otro método de cultivo heterotrófico alternativo de acuerdo con la presente invención, que puede opcionalmente ser usado por sí mismo en combinación con los métodos descritos anteriormente, sacarosa, producido por ejemplo a partir de caña de azúcar o remolacha de azúcar, es usada como materia prima de alimentación. Como se describe en mayor detalle en la sección intitulada “Diseño de Microbios” posteriormente en la presente, la producción de lípido puede ser facilitada o hacerse más eficiente por medio del diseño de microbios tales *Chlorella*, para utilizar sacarosa como fuente de carbono. Por ejemplo, la expresión de un transportador de

ascarasa y una invertasas agarosa permite que *Chlorella* transporte sacarosa a la célula del medio de cultivo e hidrolice sacarosa para producir glucosa y fructosa. Opcionalmente, una fructocinasa puede ser expresada también en instancias en donde la actividad de hexocinasa endógena es suficiente para la fosforilación máxima de fructosa. Ejemplos de transportadores útiles de sacarosa apropiados son los números de acceso GenBank CAD91334, CAB92307 y CAA53390. Ejemplos de invertasas de sacarosa apropiados son números de acceso GenBank CAB95010, NP_012104 y CAA06839. Ejemplos de invertasas de sacarosa apropiadas son números de acceso de GenBank P26984, P26420 y CAA43322. Vectores para transformación de microalgas, en las que se incluyen *Chlorella*, que codifican uno o más de tales genes pueden ser diseñados como se describe en la presente.

La secreción de una invertasa de sacarosa puede obviar la necesidad de expresión de un transportador que puede transportar sacarosa a la célula. Esta es debida a una invertasa secretada cataliza la conversión de una molécula de sacarosa en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa, ambas que pueden ser transportadas y utilizadas por los microbios revelados en la presente. Por ejemplo, la expresión de una invertasa de sacarosa (tal como SEQ ID NO: 14) con una señal de secreción (tal como aquella de SEQ ID NO: 15 (de levadura), SEQ ID NO: 16 (de plantas superiores), SEQ ID NO: 17

(señal de secreción de consenso eucarióntica) y SEQ ID BO: 18 (combinación de secuencias de señal de plantas superiores y consenso eucarióntico) generan actividad de invertasa al exterior de la célula. Véase Hawkins et al., Curren Microbiology Vol. 38 (1999), pp. 335-341 para ejemplos de señales de secreción activa en *Chlorella*. La expresión de tal proteína, tal como la deshabilitada por la metodología de diseño genético revelada en la presente, permite que las células sean capaces de utilizar glucosa extracelular como una fuente de energía al utilizar sacarosa como una fuente de energía extracelular. En células tales como *Chlorella protothecoides, Chlorella minutissima* y *Chlorella emersonii* tales como las demostradas en la presente pueden usar tanto fructosa extracelular como glucosa extracelular como fuentes de energía, la secreción de una invertasa puede proporcionar la única actividad catalítica necesaria para usar sacarosa como una fuente de energía eficiente, no cara.

Por ejemplo, como se muestra en la Figura 26, *Chlorella protothecoides* puede ser diseñada con un gen de invertasa de sacarosa bajo el control regulador de uno de tres promotores (promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CMV), promotor de virus de *Chlorella* (CV) o promotor HUP1 de *Chlorella* (HUP1)). El gen de invertasa de sacarosa utilizado en este ejemplo comprende una modificación al gen SUC2 de *S. cerevisiae* para optimizar el uso del codón de *C.*

protothecoides. El cADN y secuencias de aminoácidos del gen optimizado corresponden a SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 19, respectivamente. Una ilustración de los constructos de plásmido usados en la transformación es mostrada en la Figura 25. La expresión de una invertasa de sacarosa secretante, tal como aquella descrita en la presente, permite el uso de melazas, jugo de caña de azúcar y otras materias primas de alimentación que contienen sacarosa para la fermentación celular.

Similarmente, las Figuras 27 y 28 muestran los resultados de transformación de *Chlorella protothecoides* y *Chlorella minutissima* y *Chlorella emersonii*, respectivamente, con el gen de invertasa sacarosa de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor de CMV.

El potencial de crecimiento de microorganismos que expresan una invertasa de sacarosa secretable exógena es ilustrado por la adición de una invertasa al medio de cultivo de *Chlorella protothecoides*, como se describe en detalle adicional en los Ejemplos. Las Figuras 23 y 24 ilustran el resultado sorprendente de que las células de *Chlorella* crecen también sobre melazas de desperdicio del procesamiento de caña de azúcar como lo hacen sobre la glucosa pura grado reactivo; el uso de este producto de desperdicio de bajo valor del procesamiento de caña de azúcar puede proveer ahorros significativos de costos en la producción de hidrocarburos y otros aceites. Las melazas contienen lignina y otros productos

de desperdicio celulósicos que envenenan muchos microorganismos y retardan su crecimiento, sin embargo se descubrió que las células de *Chlorella* prosperan en presencia de tales venenos. Las Figuras 23-24 muestran el crecimiento de células sobre tres fuentes únicas de melazas (designadas como BS1, BS2 y HTM), en comparación con el crecimiento sobre glucosa o sacarosa en presencia o ausencia de una invertasa de sacarosa extracelular.

Alternativamente, una invertasa de sacarosa puede también ser expresada intracelularmente en células que expresan un transportador de sacarosa, también como en células que expresan cualquier transportador de carbohidrato que permiten que la sacarosa entre a la célula.

Un gen extraño fue transformado a y expresado en *Chlorella protothecoides*, como se describe en el Ejemplo 12. La expresión del gen de utilización de sacarosa puede ser acompañado utilizando la misma metodología o metodología similar y diseño de vector.

Se pueden emplear biorreactores para uso en los métodos de crecimiento heterotróficos. Como se apreciará, precisiones hechas para hacer la luz disponible a las células en métodos de cultivo fotosintéticos son innecesarias cuando se usa una fuente de carbono fija en los métodos de cultivo heterotróficos descritos en la presente.

Los ejemplos específicos de condiciones de proceso y métodos de crecimiento heterotróficos descritos en la presente

pueden ser combinados de cualquier manera apropiada para mejorar las eficiencias de crecimiento microbiano y producción de lípidos. Además, la invención incluye la selección y/o diseño genético de microbios, tales como microalgas, para producir microbios que son aún más apropiados para uso en los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, los microbios que tienen una mayor habilidad para utilizar cualquiera de las materias primas de alimentación descritas en la presente para la proliferación incrementada y/o producción de lípido (por ejemplo, ácidos grasos) están dentro del alcance de la invención.

C. Crecimiento mixotrófico

El crecimiento mixotrófico es el uso tanto de luz como fuentes de carbono fijas como fuentes de energía para el crecimiento de células que produzcan hidrocarburos. El crecimiento mixotróficos se puede llevar a cabo en un fotobiorreactor. Las microalgas pueden ser cultivadas y mantenidas en fotobiorreactores cerrados fabricados de diferentes tipos de material transparente o semitransparente. Tal material puede incluir envolventes de Plexiglas®, envolventes de vidrio, bolsas fabricadas de sustancias tales como polietileno, tubos transparentes o semitransparentes y otros materiales. Las microalgas pueden ser cultivadas o mantenidas en fotobiorreactores abiertos tales como lagunas de

canales, lagunas de tratamiento y otros recipientes no encerrados.

D. Medios de cultivo

Microorganismos útiles de acuerdo con el método de la presente invención son encontrados en varias locaciones y medios ambientes en todo el mundo. Como consecuencia de su aislamiento de otras especies y su divergencia evolutiva constante, el medio de cultivo particular para el crecimiento óptimo y generación de constituyentes de lípido y/o hidrocarburo pueden ser difíciles de predecir. En algunos casos, ciertas cepas de microorganismos pueden ser no aptas de crecer sobre un medio de cultivo particular debido a la presencia de algún componente inhibidor o a la ausencia de algún requerimiento nutricional esencial requerido por la cepa particular del microorganismo.

Medios de cultivo sólidos y líquidos están en general disponibles de una amplia variedad de fuentes e instrucciones para la preparación de medios particulares que son apropiados para una amplia variedad de cepas de microorganismos se pueden encontrar por ejemplo, en línea en http://www.utex.org/, un sitio mantenido por la Universidad de Texas en Austin para su recolección de cultivo de algas (UTEX). Por ejemplo, varios medios e agua dulce y agua salada incluyen aquellos mostrados en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Medios de algas ejemplares.

Medio de agua dulce	Medio de agua salada
Medio de diatomea 1/2 CHEV	1% F/2
Medio de diatomea 1/3 CHEV	Medio de agua de mar enriquecido 1/2
Medio de diatomea 1/5 CHEV	Medio Erdchreiber 1/2
DYIII/PEA + Gr+ 1:1	Medio de agua de mar + 1/2 de sustrato
Medio de diatomea 2/3 CHEV	Medio de agua de mar + 1/3 de sustrato
Medio de diatomea 2X CHEV	1/4 ERD
Medio de diatomea Ag	Medio de agua de mar + 1/4 de sustrato
Medio Allen	Medio de agua de mar + 1/2 de sustrato
Medio BG11-1	Medio de agua de mar enriquecido 2/3
Medio INV Negritas	20% Allen + 80% ERD
Medio 3N Negritas	Medio de Erdschreiber 2X
Medio de Botryococcus	Medio de agua de mar + sustrato 2X
Medio Bristol	Medio F/2 al 5%
Medio de diatomea CHEV	Medio de agar en agua de mar + sustrato 5/3

Medio de Chu	Medio artificial de agua de mar
Medio de diatomea CR1	BG11-1 + Medio de NaCl al 36%
Medio de diatomea XR1+	BG11-1 + Medio de NaCl al 1%
Medio de diatomea CR1-S	INV Negritas:Erdshreiber (1:1)
Medio de Cyanidium	INV Negritas:Erdshreiber (4:1)
Medio de cianofíceas	Medio de Bristol-NaCl
Medio Desmid	Medio de agua de mar con Dasycladales
Medio DYIII	Medio de agua de mar enriquecido
Medio Euglena	Medio Erdshreiber
Medio HEPES	Medio de agua de mar enriquecido ES/10
Medio J	Medio de agua de mar enriquecido ES/2
Medio Malt	Medio de agua de mar enriquecido ES/4
Medio MES	Medio F/2
Medio modificado 3N Negritas	F/2 + NH4
Medio modificado COMBO	Medio LDM
Medio N/20	CHEV modificado 2 X
Medio Ochromonas	CHEV modificado 2 X + sustrato
Medio P49	Medio artificial modificado de agua de mar
Medio Polytomella	CHEV modificado
Medio proteosa	Medio Porphridium
Medio de alga congelada	Medio de agua de mar + sustrato
Medio con extracto de sustrato	Medio de diatomea SS
Sustrato en agua: Medio BAR	
Sustrato en agua: Medio-GR	
Sustrato en agua: Medio GR-/NH4	
Sustrato en agua: Medio GR+	
Sustrato en agua: Medio GR+/NH4	
Sustrato en agua: Medio PEA	
Sustrato en agua: Medio de turba	
Sustrato en agua: Medio VT	
Medio Spirulina	
Medio de unión	
Medio Trebouxia	
Medio Volvocáceo	
Medio volvocáceo-3N	
Medio Volvox	
Medio Volvox-Dextrosa	
Medio Waris	
Waris + medio con extracto de sustrato	

En un ejemplo particular, un medio apropiado para el cultivo de *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) comprende medio de proteosa. Este medio es apropiado para cultivos axénicos y un volumen de un litro del medio (pH de aproximadamente 6.8) puede ser preparado mediante la adición de un gramo de peptona

proteosa a un litro de medio de Bristol. El medio de Bristol comprende $NaNO_3$ 2.94 mM, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.17 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 mM, KH_2PO_4 0.43 mM, 1.29 mM y NaCl 1.43 mM en una solución acuosa. Para un medio de agar al 1.5%, se pueden agregar 15 g de agar a un litro de la solución. La solución es cubierta y puesta en autoclave y luego almacenada a una temperatura refrigerada antes de su uso.

Otros medios apropiados para uso con los métodos de la invención pueden ser identificados fácilmente al consultar la URL identificada anteriormente o al consultar otras organizaciones que mantienen cultivos de microorganismos, tales como SAG, CCAP o CCALA. SAG se refiere a la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Göttingen (Göttingen, Alemania), CCAP se refiere a la colección de cultivos de algas y protozoarios administrada por la Asociación Escocesa para las Ciencias Marinas (Escocia, Reino Unido de la Gran Bretaña) y CCALA se refiere a la colección de cultivos de algas en laboratorio en el Instituto de Botánica (Třeboň, República Checa).

E. Rendimiento incrementado de lípidos

Las condiciones del proceso pueden ser ajustadas para incrementar el rendimiento de lípidos apropiados para un uso particular y/o para reducir el costo de producción. Por ejemplo, en ciertas modalidades, un microbio (por ejemplo, una

microalga) es cultivado en presencia de una concentración limitante de uno o más nutrientes, tales como por ejemplo, carbono y/o nitrógeno, fósforo o azufre, en tanto que se proporciona un exceso de energía de carbono fija como glucosa. La limitación de nitrógeno tiende a incrementar el rendimiento del lípido microbiano con respecto al rendimiento del lípido microbiano en un cultivo en el cual se proporciona nitrógeno en exceso. En modalidades particulares, el incremento en rendimiento de lípido es de por lo menos aproximadamente: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500%. El microbio puede ser cultivado en presencia de una cantidad limitante de un nutriente por una porción del período de cultivo total o por todo el período. En modalidades particulares, la concentración del nutriente es sometida a ciclos entre una concentración limitante y una concentración no limitante por lo menos dos veces durante el período de cultivo total.

Para incrementar el rendimiento del lípido, se puede usar ácido acético como materia prima de alimentación para un microbio que produce lípido (por ejemplo, microalgas). El ácido acético se alimenta directamente al punto de metabolismo que inicia la síntesis del ácido graso (esto es, acetil-CoA); proporcionando así ácido acético en el cultivo que puede incrementar la producción de ácido graso. En general, el microbio es cultivado en presencia de una cantidad suficiente

de ácido acético para incrementar el rendimiento de lípido microbiano y/o el rendimiento de ácido graso microbiano, específicamente, con respecto al rendimiento del lípido microbiano (por ejemplo, ácidos grasos) en ausencia del ácido acético.

En otra modalidad, el rendimiento del lípido es incrementado al cultivar un microbio que produce lípidos (por ejemplo, microalgas) en presencia de uno o más co-factores para una enzima de ruta de lípido (por ejemplo, una enzima sintética de ácido graso). En general, la concentración del (los) co-factor (es) es suficiente para incrementar el rendimiento del lípido microbiano (por ejemplo ácido graso) con respecto al rendimiento del lípido microbiano en ausencia del (los) co-factor (es). En una modalidad particular, el (los) co-factor (es) es (son) provisto (s) al cultivo al incluir en el cultivo un microbio (por ejemplo, microalgas) que contiene un gen exógeno que codifica el (los) co-factor (es). Alternativamente, se pueden proveer co-factores a un cultivo al incluir un microbio (por ejemplo, microalgas) que contiene un gen exógeno que codifica una proteína que participa en la síntesis del co-factor. En ciertas modalidades, co-factores apropiados incluyen cualquier vitamina requerida por una enzima de ruta de lípido, tal como por ejemplo: biotina, pantotenato. Genes que codifican co-factores apropiados para uso en la invención o que participan en la síntesis de tales co-factores son bien

conocidos y pueden ser introducidos a microbios (por ejemplo, microalgas) utilizando conceptos y técnicas tales como aquellos descritos anteriormente.

V. DISEÑO DE RUTA DEL LÍPIDO

En algunas modalidades de la presente invención, los microorganismos de la presente invención son modificados para alterar las propiedades y/o proporciones de lípidos conocidos y/o para incrementar el flujo de carbono a los lípidos. La ruta puede además o alternativamente ser modificada para alterar las propiedades y/o proporciones de varias moléculas de hidrocarburo producidas por medio del procesamiento enzimático de lípidos.

A. Alteración de propiedades o proporción de lípido o hidrocarburos producidos

En el caso de microalgas, algunas células tipo silvestre ya tienen características de crecimiento buenas pero no producen los tipos o cantidades deseados de lípidos. Ejemplos incluyen *Pyrobotrys*, *Phormidium*, *Agmenellum*, *Carteria*, *Lepocinclis*, *Pyrobotrys*, *Nitzschia*, *Lepocinclis*, *Anabaena*, *Euglena*, *Spirogyra*, *Chlorococcum*, *Tetraedron*, *Oscillatoria*, *Phagus* y *Chlorogonium* que tienen la característica de crecimiento deseable de crecimiento en aguas residuales municipales o agua de desperdicio. Tales células, también como

especies de *Chlorella* y otros microbios, pueden ser diseñados para tener características de producción de lípido mejoradas. Las características deseadas incluyen optimización del rendimiento de lípido por volumen unitario y/o por tiempo unitario, longitud de cadenas de carbono (por ejemplo, para producción de biodiesel o para aplicaciones iníciales que requieren materia prima de alimentación de hidrocarburo), reduciendo el número de dobles o triples enlaces, opcionalmente a cero, remover o eliminar anillos y estructuras cíclicas e incrementar la proporción de hidrógeno: carbono de una especie particular de lípido o de una población de lípido distinta. Además, las microalgas que producen hidrocarburos apropiados pueden también ser diseñadas para tener salidas de hidrocarburos aún más deseables. Ejemplos de tales microalgas incluyen especies del género *Chlorella*.

1. Regulación de enzimas que controlan los puntos de ramificación en la síntesis de ácido graso

En modalidades particulares, una o más enzimas clave que controlan los puntos de ramificación en el metabolismo para la síntesis de ácido graso pueden ser reguladas ascendentemente o reguladas descendentemente para mejorar la producción del lípido. La regulación ascendente puede ser detenida por ejemplo al transformar células con los conceptos de expresión en los cuales un gen que codifica la enzima de interés es expresada,

por ejemplo utilizando un promotor fuerte y/o elementos de mejorador que incrementan la transición. Tales conceptos pueden incluir un marcador seleccionable, de tal manera que los transformantes pueden ser sometidos a selección, lo que puede dar como resultado la aplicación del concepto y un incremento en el nivel de expresión de la enzima codificada. Ejemplos de enzimas apropiadas para la regulación ascendente de acuerdo con los métodos de la invención incluyen piruvato deshidrogenasa, que juega un papel para convertir piruvato a acetil-CoA (ejemplos, algunos de algas, incluyen los números de accesos Genbank NP_415392; AAA53047; Q1XDM1 y CAF05587). La regulación ascendente de la piruvato deshidrogenasa puede incrementar la producción de acetil-CoA e incrementar mediante esto la síntesis de ácido graso. La acetil-CoA carboxilasa cataliza la etapa inicial en la síntesis de ácido graso. Así, esta enzima puede ser regulada ascendentemente para incrementar la producción de ácidos grasos (ejemplo, algunos de microalgas, incluyen los números de acceso Genbank BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP_537052; YP_536879; NP_045833 y BAA57908). La producción de ácido graso puede también ser incrementada mediante la regulación ascendente de la proteína portadora de acilo (ACP), que porta las cadenas de acilo crecientes durante la síntesis de ácido graso (ejemplos, algunos de microalgas, incluyen los números de acceso Genbank A0T0F8; P51280; NP_84041; YP_874433). La glicerol-3-fosfatoacetiltransferasa

cataliza la etapa limitante de la velocidad de la síntesis de ácido graso. La regulación ascendente de esta enzima puede incrementar la producción de ácido graso (ejemplos, algunos de microalgas, incluyen los números de acceso Genbank AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857 y ABO94442). Las proteínas precedentes son candidatos para expresión en microalgas, en las que se incluyen especies del género *Chlorella*.

La regulación descendente de una enzima de interés puede ser obtenida utilizando por ejemplo ARN/ADN catalítico antisentido, interferencia de ARN (ARN_i), "desactivación", "apagado" u otras técnicas de mutagénesis. La expresión/función de enzima puede también ser inhibida utilizando intracuerpos. Ejemplos de enzimas apropiadas para regulación descendente de acuerdo con los métodos de la invención incluyen citrato sintasa, que consume acetil-CoA como parte del ciclo de ácido tricarboxílico (TCA). La regulación descendente de citrato sintasa puede forzar a más acetil-CoA a la ruta de síntesis de ácido graso.

2. Modulación de reguladores globales de genes de síntesis de ácido graso

Los reguladores globales modulan la expresión de los genes de las rutas biosintéticas de ácido graso. Así, uno o más reguladores globales de la síntesis de ácido graso deben ser regulados ascendentemente o regulados descendentemente, como

sea apropiado, para inhibir o mejorar, respectivamente, la expresión de una prioridad de genes sintéticos de ácido graso y finalmente, para incrementar la producción de lípido. Ejemplos incluyen proteínas de enlace de elementos regulatorios de esterol (SREBPs), tales como SREBP-1a y SREBP-1c (para ejemplos véanse los números de acceso Genbank NP_035610 y Q9WTN3). Los reguladores globales pueden ser regulados ascendentemente o regulados descendentemente, por ejemplo, como se describe anteriormente con respecto a la regulación de enzima de punto de control.

3. Regulación de enzima de modificación de hidrocarburo

Los métodos de la invención también incluyen células transformantes, con uno o más genes que codifican enzimas de modificación de hidrocarburo tales como por ejemplo una acil-ACP tioesterasa grasa (véanse ejemplos en la tabla 5 con números de acceso), una acil-CoA/aldehído reductasa grasa (véanse ejemplos en la tabla 6 con números de acceso), una acil-CoA reductasa grasa (véanse ejemplos en la tabla 7 con números de acceso), una aldehído descarbonilasa grasa (véanse ejemplos en la tabla 8 con números de acceso), una aldehído reductasa grasa o un gen de escualeno sintasa (véase número de acceso Genbank AF205791). En algunas modalidades, genes que codifican una acil-ACP tioesterasa grasa y una proteína portadora de acilo co-expresada naturalmente pueden ser

transformados a una célula, opcionalmente con uno o más genes que codifican otras enzimas de modificación de hidrocarburo. En otras modalidades, la ACP y acil-ACP tioesterasa grasa pueden tener una afinidad entre sí que imparte una ventaja cuando las dos son usadas conjuntamente en los microbios y métodos de la presente invención, sin consideración de si son co-expresadas naturalmente en un tejido u organismo particular. Así, la presente invención contempla tanto pares co-expresados naturalmente de estas enzimas, también como aquellos que comparten una afinidad para interactuar entre sí para facilitar la escisión de una cadena de carbono de los sitios específica de la ACP.

En todavía otras modalidades, un gen exógeno que codifica una desaturasa puede ser transformado a la célula en conjunción con uno o más genes que codifican otras enzimas de modificación de hidrocarburos con el fin de proveer modificaciones con respecto a la saturación de hidrocarburo. La estearoil-ACP desaturasa (véase, por ejemplo números de acceso Genbank AAF15308; ABM45911 y AAY86086), por ejemplo cataliza la conversión de estearoil-ACP a oloil-ACP. La regulación ascendente de este gen puede incrementar la proporción de ácidos grasos monoinsaturados producidos por una célula; mientras que la regulación descendente puede reducir la proporción de monoinsaturados. Similarmente, la expresión de una o más glicerolípido desaturasas puede ser controlada para

alterar la proporción de los ácidos grasos insaturados a saturados, tales como desaturasa de ácido graso omega-6, desaturasa de ácido graso omega-3, o desaturasa omega-6-oleato. En algunas modalidades, la desaturasa puede ser seleccionada con referencia a una longitud de cadena de carbono deseada, de tal manera que la desaturasa es capaz de realizar modificaciones específicas de sitio dentro de un sustrato de longitud de carbono especificado o sustratos que tienen una longitud de carbono dentro de un intervalo especificado.

En modalidades particulares, los microbios de la presente invención son diseñados genéticamente para expresar uno o más genes exógenos seleccionados de una acil-ACP tioesterasa grasa, acil-CoA/aldehído reductasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, un aldehído reductasa grasa, un aldehído descarbonilasa grasa o una proteína portadora de acilo co-expresada naturalmente. Métodos de expresión apropiados son descritos anteriormente con respecto a la expresión de un gen de lipasa, en los que se incluyen, entre otros métodos, expresión inducible y expresión por combatimientos.

Sin pretender estar limitados por alguna teoría particular o mecanismo celular, una acil-ACP tioesterasa grasa escinde un ácido graso de una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis de lípido. Por medio de tratamiento enzimático adicional, el acido graso escindido es luego combinado con una co-enzima para producir una molécula de acil-

CoA. Esta acil-CoA es el sustrato para la actividad enzimática de una acil-CoA reductasa grasa para producir un aldehído, también como para una acil-CoA/aldehído reductasa grasa para producir un alcohol. El aldehído producido por la acción de la acil-CoA reductasa grasa identificado anteriormente es el sustrato para actividad enzimática adicional ya sea por una aldehído reductasa grasa para producir un alcohol o un aldehído desacaboxilasa grasa para producir un alcano o alqueno.

Las enzimas descritas directamente antes tienen una especificidad para actuar sobre un sustrato que incluye un número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, una acil-ACP tioesterasa grasa puede tener una especificidad para escindir un ácido graso que tiene doce átomos de carbono de la ACP. En algunas modalidades, la ACP y la tioesterasa longitud-específica pueden tener una afinidad entre sí que las hace particularmente útiles como una combinación (por ejemplo, la ACP exógena y los genes de tioesterasa pueden ser co-expresados naturalmente en un tejido u organismo particular del cual son derivados). Por consiguiente, en varias modalidades, el microbio puede contener un gen exógeno que codifica una proteína con especificidad para catalizar una actividad enzimática (por ejemplo, escisión de un ácido graso de una ACP, reducción de una acil-CoA a un aldehído o un alcohol o conversión de un aldehído a un alcano) con respecto al número de átomos de carbono contenidos en el sustrato. La

especificidad enzimática puede ser en varias modalidades, por un sustrato que tiene de 8 a 34 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 18 átomos de carbono y más preferiblemente de 10 a 14 átomos de carbono. La especificidad más preferida es para un sustrato que tienen doce átomos de carbono. En otras modalidades, la especificidad puede ser para 20 a 30 átomos de carbono.

Acil-ACP tioesterasa grasa apropiada para uso con los microbios y métodos de invención incluyen sin limitación aquellos indicados en la tabla 5.

Tabla 5. Acil-ACP tioesterasas grasas y números de acceso Genbank

Umellularia califórnica acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAC49001)
Cinnamomum camphora acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # Q39473)
Umbellularia califórnica acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # Q41635)
Myristica fragrans acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAB71729)
Myristica fragrans acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAB71730)
Elaeis guineensis acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABD83939)

Elaeis guineensis acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAD42220)

Populus tormentosa acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABC47311)

Arabidopsis thaliana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # NP_172327)

Arabidopsis thaliana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAA85387)

Arabidopsis thaliana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAA85388)

Gossypium hirsutum acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # O9SOI3)

Cuphea lanceolata acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAA54060)

Cuphea hookeriana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAC72882)

Cuphea calophylla subsp. mesostemon acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABB71581)

Cuphea lanceolata acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAC19933)

Elaeis guineensis acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAL15645)

Cuphea hookeriana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # Q39513)

Gossypium hirsutum acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank #

AAD01982)

Vitis vinifera acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # CAN81819)

Garcinia mangostana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAB51525)

Brassica juncea acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABI18986)

Madhuca longifolia acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAX51637)

Brassica napus acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # ABH11710)

Oryza sativa (grupo de cultivo indica) acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # EAY86877)

Oryza sativa (grupo de cultivo japonica) acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # NP_001068400)

Oryza sativa (grupo de cultivo indica) acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # EAY99617)

Cuphea hookeriana acil-ACP tioesterasa grasa (GenBank # AAC49269)

Acil-CoA grasas/aldehído reductasa grasa apropiadas para uso con microbios y métodos de invención incluyen sin limitación aquellas enlistadas en la tabla 6.

Tabla 6. Acil- CoA/aldehído reductasa grasas enlistadas por número de acceso Gen Bank.

AAC45217, YP_047869, BAB85476, YP_001086217, YP_001280274,

YP_264583, YP_436109, YP_959769, ZP_01736962, ZP_01900335, ZP_01892096, ZP_01103974, ZP_01915077, YP_924106, YP_130411, ZP_01222731, YP_550815, YP_983712, YP_001019688, YP_524762, YP_856798, ZP_011155000, YP_001141848, NP_336047, NP_216059, YP_882409, YP_706156, YP_001136150, YP_952365, ZP_01221833, YP_130076, NP_567936, AAR88762, ABK28586, NP_197634, CAD30694, NP_001063962, BAD46254, NP_001030809, EAZ10132, EAZ43639, EAZ07989, NP_001062488, CAB88537, NP_001052541, CAH66597, CAE02214, CAH66590, CAB88538, EAZ39844, AAZ06658, CAA68190, CAA52019 y BAC84377

Acil-CoA reductasas grasas apropiadas para uso con los microbios y métodos de la invención incluyen sin limitación aquellas enlistadas en la tabla 7.

Tabla 7. Acil-CoA reductasas grasas enlistadas por números de acceso de Gen Bank

NP_187805, ABO14927, NP_001049083, CAN83375, NP_191229, EAZ42242, EAZ06453, CAD30696, BAD31814, NP_190040, AAD38039, CAD30692, CAN81280, NP_197642, NP_190041, AAL15288 y NP_190042

Aldehído descarbonilasas grasas apropiadas para uso con los microbios en métodos de la invención incluyen sin limitación aquellas enlistadas en la tabla 8.

Tabla 8. Aldehído descarbonilasas grasas enlistadas por números de acceso Gen Bank.

NP_850932, ABN07985, CAN60676, AAC23640, CAA65199, AAC24373, CAE03390, ABD28319, NP_181306, EAZ31322, CAN 63491, EAY94825, EAY86731, CAL55686, XP_001420263, EAZ23849, NP_20058, NP_001063227, CAN83072, AAR90847 y AAR97643

Combinaciones de acil-ACP tioesterasas grasas co-expresadas naturalmente y proteínas portadoras de acilo son apropiadas para uso con los microbios y métodos de la invención.

Ejemplos adicionales de enzimas de modificación de hidrocarburos incluyen secuencias de aminoácidos contenidas en o a las que se hace referencia en o codificadas por secuencias de ácidos nucléicos contenidas o a las que se hace referencia en cualquiera de las siguientes patentes estadounidenses: 6,610,527; 6,451,576; 6,429,014; 6,342,380; 6,265,639; 6,194,185; 6,114,160; 6,083,731; 6,043,072; 5,994,114; 5,891,697; 5,871,988; 6,265,639 y descritos adicionalmente en números de acceso Gen Bank: AAO18435; ZP_00513891; Q38710; AAK60613, AA60610; AAK60611; NP_113747; CAB75874; AAK60612; AAF20201; BAA11024; AF20591 y CAA03710.

Otras enzimas apropiadas para uso con los microbios y

los métodos de la invención incluyen aquellas que tienen por lo menos 70% de identidad de aminoácido con una de las proteínas enlistadas en la tabla 5-8 y que exhiben la actividad enzimática deseada correspondiente (por ejemplo, escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilo, reducción de una acil-CoA a un aldehído o un alcohol o conversión de un aldehído a un alcano). En modalidades adicionales, la actividad enzimática está presente en una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99% de identidad con una de las secuencias descritas anteriormente, todas las cuales son incorporadas en la presente por referencia como si se resumieran plenamente.

Las enzimas de modificación de hidrocarburos descritas anteriormente son útiles en la producción de varios hidrocarburos a partir de un microbio (por ejemplo, una microalga, una levadura oleaginosa u hongo) o población de microbios, mediante lo cual una acil-ACP tioesterasa grasa escinde un ácido graso de una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis del lípido. Por medio de tratamiento enzimático adicional, el acido graso escindido es luego combinado con una co-enzima para producir una molécula de acil-CoA. Este acil-CoA es el sustrato para la actividad enzimática de una acil-CoA reductasa grasa para producir un aldehído,

también como para una acil-CoA/aldehído reductasa grasa para producir un alcohol. El aldehído producido por la acción de la acil-CoA reductasa grasa identificado anteriormente es el sustrato para actividad enzimática adicional ya sea por un aldehído reductasa grasa para producir un alcohol o un aldehído descarbonilasa grasa para producir un alcano o alqueno.

Las enzimas de modificación de hidrocarburo tienen especificidad para actuar sobre un sustrato que incluye un número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, una acil-ACP tioesterasa grasa puede tener especificidad para escindir un ácido graso que tiene 12 átomos de carbono de la ACP. Por consiguiente, en varias modalidades, el microbio puede contener un gen exógeno que codifica una proteína con especificidad para satelizar una actividad enzimática (por ejemplo, escisión de un ácido graso de una ACP, reducción de una acil-CoA a un aldehído o un alcohol o conversión de un aldehído a un alcano) con respecto al número de átomos de carbono contenidos en el sustrato. La especificidad enzimática puede ser en varias modalidades por un sustrato que tiene de 8 a 34 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 14 átomos de carbono y más preferiblemente de 10 a 14 átomos de carbono. La especificidad más preferida es por un sustrato que tiene 12 átomos de carbono. En otras modalidades, la especificidad puede ser por 20 a 30 átomos de carbono.

En algunas modalidades, ácidos grasos o los alcoholes

primarios correspondientes, aldehídos, alcanos o alquenos, generados por los métodos descritos en la presente, contienen por lo menos aproximadamente 8, por lo menos aproximadamente 10, por lo menos aproximadamente 12, por lo menos aproximadamente 14, por lo menos aproximadamente 16, por lo menos aproximadamente 18, por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 22, por lo menos aproximadamente 24, por lo menos aproximadamente 26, por lo menos aproximadamente 28, por lo menos aproximadamente 30, por lo menos aproximadamente 32 o por lo menos aproximadamente 34 de átomos de carbono o más. Ácidos grasos preferidos para la producción de biodiesel, diesel renovable o combustible de jet o los alcoholes primarios correspondientes, aldehídos, alcanos y alquenos para aplicaciones industriales contienen por lo menos aproximadamente 8 átomos de carbono o más. En ciertas modalidades, los ácidos grasos anteriores, también como la otras moléculas de hidrocarburo correspondientes están saturados (sin ningún doble o triple enlace carbono carbono); mono-insaturado (un solo doble enlace); poliinsaturados (dos o más dobles enlaces); son lineales (no cíclicos) y/o tienen poca o ninguna ramificación en sus estructuras.

Al seleccionar la combinación deseada de genes exógenos a ser expresados, se puede confeccionar el producto generado por el microbio, que puede luego ser extraído de la biomasa acuosa. Por ejemplo, el microbio puede contener: i) un

gen exógeno que codifica una acil-ACP tioesterasa grasa y opcionalmente ii) una proteína portadora de acilo co-expresada naturalmente o una proteína portadora de acilo que tiene de otra manera actividad por la acil-ACP tioesterasa grasa (o inversamente) y opcionalmente iii) un gen exógeno que codifica una acil-CoA/aldehído reductasa grasa o una acil-CoA reductasa grasa y opcionalmente iv)un gen exógeno que codifica una aldehído reductasa grasa o una aldehído descarbonilasa grasa. El microbio, cuando es cultivado como se describe posteriormente en la presente, sintetiza un ácido graso enlazado a una ACP y la acil-ACP tioesterasa grasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP para producir, por medio de procesamiento enzimático adicional, una molécula de acil-CoA grasa. Cuando está presente, la acil-CoA/aldehído reductasa grasa cataliza la reducción de la acil-CoA a un alcohol. Similarmente, la acil-CoA reductasa grasa, cuando está presente, cataliza la reducción de la acil-CoA a un aldehído. En aquellas modalidades en las cuales un gen exógeno que codifica una acil-CoA reductasa grasa está presente y es expresada para producir un producto de aldehído, una aldehído reductasa grasa, codificada por el tercer gen exógeno, cataliza la reducción del aldehído a un alcohol. Similarmente, una aldehído descarbonilasa grasa cataliza la compresión del aldehído a un alcano o un alqueno, cuando está presente.

Genes que codifican tales enzimas pueden ser

obtenidos de células que ya se sabe que exhiben producción de lípidos significativas tales como Chlorella protothecoides. Los genes ya conocidos que tienen un papel en la producción de lípidos, por ejemplo, un gen que codifica una enzima que satura dobles enlaces, puede ser transformado individualmente a células receptoras. Sin embargo, para la práctica de la invención no es necesario hacer suposiciones a priori en cuanto a cuáles genes son requeridos. Una biblioteca de ADN que contiene diferentes genes, tales como cADN de un organismo de producción de lípidos bueno, puede ser transformada a células receptoras. El cADN está preferiblemente en enlace operable con un promotor activo en microalgas. Diferentes células de microalgas receptoras transformadas por una biblioteca reciben diferentes genes de la biblioteca. Transformantes que tienen producción de lípido mejorada son identificados por medio de métodos de selección conocidos en el arte, tales como por ejemplo ácido HPLC, cromatografía de gases y métodos de espectometría de masas de análisis de hidrocarburo (para ejemplos de tales análisis, véase Biomass and Bioenergy Vol. 6. No. 4. pp. 269-274 (1994); Experientia 38; 47-49 (1982); y Phytochemistry 65 (2004) 3159-3165). Estos transformantes son luego sometidos a transformación adicional con la biblioteca original y/o inter-cruzados opcionalmente para generar una ronda adicional de organismos que tienen producción de lípidos mejorada. Procedimientos generales para desarrollar organismos

enteros para adquirir una propiedad deseada son descritos en por ejemplo Patente Estadounidense 6,716,631. Tales métodos abarcan, por ejemplo introducir una biblioteca de fragmentos de ADN a una pluralidad de células, mediante lo cual por lo menos uno de los fragmentos sufre recombinación con un segmento en el genoma o un episoma de las células para producir células modificadas. Las células modificadas son luego seleccionadas en cuanto a células modificadas que han evolucionado hacia la adquisición de la función deseada. Vectores y métodos para transformación son análogos a aquéllos discutidos en relación con la expresión de genes de lipasa.

Además, se pueden usar bibliotecas sustractivas para identificar genes cuya transcripción es inducida bajo condiciones diferentes, especialmente condiciones empleadas en el cultivo de microorganismos para la producción de biodiesel o para la producción de hidrocarburos útiles como una materia prima de alimentación para aplicaciones industriales. Las bibliotecas sustractivas contienen secuencias de nucleótidos que reflejan la diferencia entre dos muestras diferentes. Tales bibliotecas son preparadas mediante procedimientos que incluyen las etapas de desnaturalización e hibridización de poblaciones de nucleótidos (por ejemplo mARN, cADN, secuencias amplificadas) de cada muestra. Las secuencias comunes a ambas muestras se hibridizan y son removidas, dejando las secuencias que difieren entre las muestras. De esta manera, las secuencias

que son inducidas bajo condiciones particulares pueden ser identificadas. Esta técnica puede ser empleada, por ejemplo para identificar genes útiles para incrementar la producción de lípido (por ejemplo, ácido graso) y en particular producción de lípido bajo cualesquier condiciones de cultivo deseadas. La técnica de hibridización sustractiva puede también ser empleada para identificar promotores, por ejemplo, promotores inducibles útiles en la expresión de constructos de acuerdo con la invención.

Así, por ejemplo, bibliotecas sustractivas pueden ser preparadas a partir de cultivos de microorganismos cultivados autotrópicamente (en la luz sin una fuente de carbono fija) o heterotrópicamente (en la oscuridad en presencia de una fuente de carbono fija). En particular, los genes heterotrópicos pueden ser inducidos durante el cultivo en la oscuridad en presencia de una fuente de carbono fija y pueden por consiguiente estar presentes en una biblioteca acelerada al sustraer secuencias de células autotróficas de secuencias de células heterotrópicas oscuras. Bibliotecas sustractivas pueden también ser preparadas a partir de cultivos a los cuales un sustrato de carbono particular, tal como glucosa, ha sido agregado para identificar genes que juegan un papel en metabolizar el sustrato. Bibliotecas sustractivas preparadas a partir de cultivos cultivados en presencia de nitrógeno en exceso contralimitado pueden ser usadas para identificar genes

que controlan la división celular en contraposición a la producción de acumulación de hidrocarburo. La preparación de una biblioteca sustractiva de un cultivo al cual lípidos (por ejemplo, ácidos grasos) han sido agregados puede ayudar a identificar genes cuya sobreexpresión implementa la producción de ácido graso. Más específicamente, la adición de ácidos grasos a un cultivo de células que pueden usar los ácidos grasos agregados conducirá a la regulación descendente de genes sintéticos de ácido graso para regular descendentemente la producción de ácido graso. La sobreexpresión de uno o más de tales genes tendrá el efecto opuesto.

B. Flujo de Carbono Incrementado a la Ruta del Lípido.

Algunas microalgas producen cantidades significativas de metabolitos sin lípidos, tales como, por ejemplo, polisacáridos. Debido a que la biosíntesis de polisacáridos puede usar una proporción significativa de la energía metabólica total disponible a las células, la mutagénesis de células productoras de lípidos seguida por selección en cuanto a producción de polisacáridos reducida o eliminada genera nuevas cepas que son capaces de producir rendimientos más altos de lípidos.

El análisis de fenol: ácido sulfúrico detecta carbohidratos (véase, Hellebust, Handbook of Phycological Methods, Cambridge University Press, 1978; y Cuesta G., et al.,

J Microbiol Methods. 2003 Jan;52(l):69-73). El análisis de azul de 1,6-dimetilmetileno detecta polisacáridos aniónicos, (véase, por ejemplo Braz J Med Biol Res. 1999 May;32(5):545-50; Clin Chem. 1986 Nov;32(l l):2073-6).

Los polisacáridos pueden también ser analizados por medio de métodos tales como HPLC, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio aniónico (véase, por ejemplo Prosky L, Asp N, Schweizer TF, DeVries JW & Furda I (1988). Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in food and food products: Interlaboratory study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 71, 1017±1023; Int J Biol Macromol. 2003 Nov;33(l-3):9- 18). Los polisacáridos también pueden ser detectados utilizando electroforésis de gel (véase, por ejemplo Anal Biochem. 2003 Oct 15;321(2):174-82; Anal Biochem. 2002 Jan l;300(l):53-68).

VI. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN DE LÍPIDOS E HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos) producidos por la célula de la invención pueden ser cosechados o recolectados de otra manera mediante cualquier medio conveniente. Por ejemplo, los hidrocarburos secretados de células pueden ser centrifugados para separar los hidrocarburos en una capa hidrofóbica de contaminantes en una capa acuosa y opcionalmente de cualesquier materiales sólidos como un precipitado después

de la centrifugación. El material que contiene células o fracciones de células puede ser tratado con proteasas para degradar proteínas contaminantes antes o después de la centrifugación. En algunas instancias las proteínas contaminantes están asociadas, posiblemente de manera covalente a hidrocarburos o precursores de hidrocarburos que forman hidrocarburos después de la remoción de la proteína. En otras instancias, las moléculas de hidrocarburo están en una preparación que también contienen proteínas. Se pueden agregar proteasas a preparaciones de hidrocarburos que contienen proteínas para degradar proteínas (por ejemplo, la proteasa de Streptomyces griseus puede ser usada (SigmaAldrich catalog number P5147)). Después de la digestión, los hidrocarburos son preferiblemente purificados de proteínas residuales, fragmentos de péptidos y aminoácidos. Esta purificación se puede llevar a cabo, por ejemplo mediante métodos enlistados anteriormente, tales como centrifugación y filtración.

Hidrocarburos extracelulares pueden también ser extraídos in vivo de células de microalgas vivientes que son luego devueltas a un birreactor mediante exposición de las células en un medio ambiente de otra manera estéril, a un solvente de extracción no tóxico, seguido por la separación de la células vivientes y la fracción hidrofóbica del solvente de extracción e hidrocarburos, en donde las células vivientes separadas son luego devueltas a un recipiente de cultivo, tal

como un fermentador de acero inoxidable o fotobioreactor (véase, Biotechnol Bioeng. 2004 Dec 5;88(5):593-600 and Biotechnol Bioeng. 2004 Mar 5;85(5):475-81).

Los hidrocarburos pueden también ser aislados mediante extracción de célula entera. Las células son primero sometidas a disrupción, como se describe en la sección intitulada "Lisis de Células" y luego los hidrocarburos asociados a la membrana celular/pared celular intracelulares también como hidrocarburos extracelulares pueden ser recolectados de toda la masa celular tal como mediante el uso de centrifugación como se describe anteriormente.

Varios métodos están disponibles para separar hidrocarburos y lípidos de lisados celulares producidos por los métodos anteriores. Por ejemplo, los hidrocarburos pueden ser extraídos con un solvente hidrofóbico tal como hexano (véase, por ejemplo Frenz et al. 1989, Enzyme Microb. Technol., 11 :717). Los hidrocarburos pueden también ser extraídos usando licuefacción (véase, por ejemplo Sawayama et al. 1999, Biomass and Bioenergy 17:33-39 y Inoue et al. 1993, Biomass Bioenergy 6(4):269-274); licuefacción de aceite (véase, por ejemplo Minowa et al. 1995, Fuel 74(12):1735-1738); y extracción de CO_2 supercrítico (véase, por ejemplo Mendes et al. 2003, Inorganica Chimica Acta 356:328-334).

Miao y Wu describen un protocolo para la recuperación del lípido microalgal de un cultivo de Chlorella

protototheocoides en el cual las células fueron cosechadas mediante centrifugación, lavadas con agua destilada y secada mediante secado por congelación. El polvo celular resultante fue pulverizado en un mortero y luego extraído con n-hexano. Miao and Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846.

A. Lisis de Células

Los lípidos intracelulares e hidrocarburos producidos en microorganismos son en algunas modalidades extraídos después de las lisis de las células del microorganismo. Una vez extraídos, los lípidos y/o hidrocarburos pueden ser refinados adicionalmente para producir aceites, combustibles u oleoquímicos.

Después de la consumación del cultivo, los microorganismos pueden ser separados del caldo de fermentación. Opcionalmente, la separación es efectuada mediante centrifugación para generar una pasta concentrada. La centrifugación no remueve cantidades significativas de agua intracelular de los microorganismos y no es una etapa de secado. La biomasa puede luego ser lavada con una solución de lavado (por ejemplo, agua DI) para deshacerse del caldo de fermentación y desechos. Opcionalmente, la biomasa microbiana lavada puede también ser secada (secada en horno, liofilizada, etc.) antes de la disrupción celular. Alternativamente, las células pueden ser sometidas a lisis sin separación de algo o

todo del caldo de fermentación cuando la fermentación está completa. Por ejemplo, las células pueden estar a una proporción de menos de 1:1 v:v de células a líquido extracelular cuando las células son sometidas a lisis.

Los microorganismos que contienen un lípido y/o hidrocarburo pueden ser sometidos a lisis para producir un lisado. Como se detalla en la presente, la etapa de lisis de un microorganismo (también denominada como lisis celular) puede ser obtenida mediante cualquier medio conveniente, en los que se incluyen lisis inducida por calor, adición de una base, adición de un ácido, utilizando enzimas tales como proteasas y enzimas de degradación de polisacárido tales como amilasas, utilizando ultrasonido, lisis mecánica, utilizando choque osmótico, infección con un virus lítico y/o expresión de uno o más genes líticos. La lisis es efectuada para liberar moléculas intracelulares que han sido producidas por el microorganismo. Cada uno de estos métodos para la lisis de un microorganismo pueden ser usados como un solo método o en combinación simultánea o secuencialmente.

La extensión de disrupción celular puede ser observada por análisis de microscopio. Utilizando uno o más de los métodos descritos en la presente, comúnmente más del 70% de ruptura celular se observa. Preferiblemente la ruptura celular es más del 80%, más preferiblemente más del 90% y más preferiblemente alrededor de 100%.

En modalidades particulares, el microorganismo es sometido a lisis después del cultivo, por ejemplo para incrementar la exposición del lípido celular y/o hidrocarburo para extracción o procesamiento adicional. La sincronización de expresión de lipasa (por ejemplo, vía un promotor inducible) o lisis celular puede ser ajustada para optimizar el rendimiento de lípidos y/o hidrocarburos. A continuación se describen un número de técnicas de lisis. Estas técnicas pueden ser usadas individualmente o en combinación.

1. Lisis inducida térmicamente

En una modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende calentamiento de una suspensión celular que contiene el microorganismo. En esta modalidad, el caldo de fermentación que contiene los microorganismos (o una suspensión de microorganismos aislados del caldo de fermentación) es calentado hasta que los microorganismos, esto es, las membranas y paredes celulares de los microorganismos se degradan o rompen. Comúnmente, las temperaturas aplicadas son de por lo menos 50°C. Temperaturas más altas, tales como, por lo menos 30°C, por lo menos 60°C, por lo menos 70°C, por lo menos 80°C, por lo menos 90°C, por lo menos 100°C, por lo menos 110°C, por lo menos 120°C, por lo menos 130°C o más altas son usadas para la lisis celular más eficiente.

La lisis de células mediante tratamiento térmico puede ser efectuada al someter a ebullición el microorganismo. Alternativamente, se puede efectuar tratamiento térmico (sin ebullición) en un autoclave. Luego el lisado tratado térmicamente puede ser enfriado para tratamiento adicional.

La disrupción celular puede también ser efectuada mediante tratamiento por vapor saturado, esto es, por medio de la adición de vapor presurizado. El tratamiento por vapor saturado de microalgas para disrupción celular se describe por ejemplo en la Patente Estadounidense 6,750,048.

2. Lisis Utilizando una Base

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende agregar una base a una suspensión celular que contiene el microorganismo.

La base debe ser lo suficientemente fuerte para hidrolizar por lo menos una porción de los compuestos proteináceos de los microorganismos usados. Las bases que son útiles para solubilizar proteínas son conocidos en el arte de química. Bases ejemplares que son útiles en los métodos de la presente invención incluyen pero no están limitados a hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de litio, sodio, potasio, calcio y mezclas de los mismos. Una base preferida es KOH. El tratamiento por base de microalgas para disrupción celular se describe por ejemplo en la Patente Estadounidense 6,750,048.

3. Lisis Ácida

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende agregar un ácido a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La lisis ácida puede ser efectuada utilizando un ácido a una concentración de 10-500 nN o preferiblemente 40-160 nM. La lisis ácida es preferiblemente efectuada a una temperatura mayor que la temperatura ambiente (por ejemplo, a 40-160°C y preferiblemente a una temperatura de 50-130°C). Para temperaturas moderadas (por ejemplo, temperatura ambiente a 100°C y particularmente temperatura ambiente a 65°), el tratamiento ácido puede ser combinado útilmente con sonificación u otros métodos de disrupción celular.

4. Lisis de Células Utilizando Enzimas

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende someter a lisis el microorganismo al usar una enzima. Enzimas preferidas para someter a lisis un microorganismo son proteasas y enzimas degradantes de polisacáridos tales como hemicelulasa (por ejemplo, hemicelulasa de Aspergillus niger; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #H2125), pectinasa, (por ejemplo, pectinasa de Rhizopus sp.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #P2401), Mannaway 4.0 L (Novozymes), celulasa (por ejemplo, celulosa de Trichoderma viride; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #C9422), y

driselasa (por ejemplo driselasa de Basidiomycetes sp.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #D9515.

a) Celulasa

En una modalidad preferida de la presente invención, una celulasa para lisis de un microorganismo es una enzima polisacárido-degradante, opcionalmente de Chlorella o un virus de Chlorella.

b) Proteasas

Proteasas tales como proteasa de Estreptomisis grisis, quimiotripsina, proteinasa K, proteasas enlistadas en Degradation of Polylactide by Commercial Proteases, Oda Yet al., Journal of Polymers and the Environment, Volume 8, Number 1, January 2000 , pp. 29-32(4), y otras proteasas pueden ser usadas para someter a lisis microorganismos. Otras proteasas que pueden ser usadas incluyen Alcalase 2.4 FG (Novozymes) and Flavourzyme 100 L (Novozymes).

c) Combinaciones

Cualquier combinación de una proteasa y una enzima polisacárido-degradante pueden también ser usadas, en las que se incluyen cualquier combinación de las proteasas precedentes y enzimas polisacáridos-degradantes.

5. Lisis de Células Utilizando Ultrasonido

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo se lleva a cabo al utilizar ultrasonido, esto es, sonificación. Así, las células pueden también ser sometidas a lisis con sonido de alta frecuencia. El sonido puede ser producido electrónicamente y transportado por medio de una junta metálica a una suspensión celular concentrada apropiadamente. Esta sonificación (o ultrasonificación) disrumpe la integridad celular en base a la creación de cavidades en la suspensión celular.

6. Lisis mecánica

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo es efectuada mediante lisis mecánica. Las células pueden ser sometidas a lisis mecánicamente y opcionalmente homogeneizadas para facilitar la recolección de hidrocarburos (por ejemplo, lípidos). Por ejemplo, un dispositivo de disruptor a presión puede ser usado para bombear una suspensión que contiene células a través de una válvula de orificio restringida. Se aplica alta presión (hasta 1500 bars) seguido por una expansión instantánea a través de una boquilla de salida. La disrupción celular se lleva a cabo mediante tres mecanismos diferentes: choque sobre la válvula, alto esfuerzo cortante de líquido en el orificio y caída de presión repentina en la descarga, provocando una

explosión de la célula. El método libera moléculas intracelulares.

Alternativamente, se puede usar un molino de bolas. En un Molino de bolas, las células son agitadas en suspensión con partículas abrasivas pequeñas, tales como perlas. Las células se rompen debido a las fuerzas cortantes, molienda entre las perlas y colisiones con perlas. Las perlas someten a disrupción las células para liberar el contenido celular. Las células pueden también ser sometidas a disrupción por fuerzas cortantes, tal como con el uso de mezcla (tal como con un mezclador a alta velocidad o mezclador Waring como ejemplos), la prensa francesa o aun centrifugación en el caso de paredes celulares débiles para someter a disrupción las células.

7. Lisis de células mediante choque osmótico (citólisis)

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo es efectuada mediante la aplicación de un choque osmótico.

8. Infección con un virus lítico

En una modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende infección de microorganismos con un virus lítico. Se conocen una amplia variedad virus para someter a lisis microorganismos apropiados

para uso en la presente invención y la selección y uso de un virus lítico particular para un microorganismo particular está dentro del nivel de habilidad de aquellos experimentados en el arte.

Por ejemplo, el virus de *Paramecium bursaria chlorella* (PBCV-1) es el prototipo de un grupo de virus de ADN de doble hebra grandes, eicosaedrales, formadores de placas (Familia Phyconaviridae, género Chlorovirus) que se replican en y someten a lisis ciertas algas verdes semejantes a *Chlorella* eucariónticas unicelulares. Así, cualquier microalga susceptible puede ser sometida a lisis al infectar el cultivo con un virus de *Chlorella* apropiado. Métodos para infectar especies de *Chlorella* con un virus de chlorella son conocidos. Véase, por ejemplo, *Adv. Virus Res.* 2006: 293-336; *Virology*, 25 de abril de 1999, 257(1): 15-23; *Virology*, 5 de enero de 2004, 318(1): 214-23; *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2000(44): 161-2; *J. Virol.*, marzo de 2006, 80(5): 2437-44 y *Annu. Rev. Microbiol.* 1999, 53: 447-94.

9. Autólisis (expresión de un gen lítico)

En otra modalidad preferida de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende autolisis. En esta modalidad, un microorganismo de acuerdo con la invención es diseñado genéticamente para producir una proteína lítica que

someterá a lisis el microorganismo. Este gen lítico puede ser expresado utilizando un promotor inducible, de tal manera que las células pueden primero ser cultivadas a una densidad deseable en un fermentador, seguido por la inducción del promotor para expresar el gen lítico para someter a lisis las células. En una modalidad, el gen lítico codifica una enzima degradante de polisacáridos.

En ciertas otras modalidades, el gen lítico es un gen de un virus lítico. Así, por ejemplo, un gen lítico de un virus de Chlorella puede ser expresado en una célula de alga del género *Chlorella* tal como *C. protothecoides*.

Métodos de expresión apropiados son descritos en la presente con respecto a la expresión de un gen de lipasa. La expresión de genes líticos se hace preferiblemente utilizando un promotor inducible, tal como un promotor activo en microalgas que es inducido mediante un estímulo tal como la presencia de una molécula pequeña, luz, calor y otros estímulos. Genes líticos de virus de chlorella son conocidos. Por ejemplo, véase *Virology* 263, 376-387 (1999) y *Virology* 230, 361-368 (1997).

B. Extracción de lípidos e hidrocarburos

Los lípidos e hidrocarburos generados por los microorganismos de la presente invención pueden ser recuperados mediante extracción con un solvente orgánico. En algunos casos, el solvente orgánico preferido es hexano. Comúnmente, el

solvente orgánico es agregado directamente al lisado sin separación previa de los componentes del lisado. En una modalidad el lisado generado por uno o más de los métodos descritos anteriormente es puesto en contacto con un solvente orgánico por un período de tiempo suficiente para permitir que los componentes de lípido y/o hidrocarburo formen una solución con el solvente orgánico. En algunos casos, la solución puede luego ser refinada adicionalmente para recuperar componentes de lípidos o hidrocarburos deseados específicos. Métodos de extracción por hexano son bien conocidos en el arte.

VII. MÉTODOS PARA EL PROCESAMIENTO DE LÍPIDOS E HIDROCARBUROS

A. Modificación enzimática

Los hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alboholes y alcanos) producidos por las células como se describe en la presente pueden ser modificados mediante el uso de una o más enzimas, en las que se incluyen una lipasa, como se describe anteriormente. Cuando los hidrocarburos están en el medio ambiente extracelular de la célula, la una o más enzimas pueden ser agregadas a aquel medio ambiente bajo condiciones en las cuales la enzima modifica el hidrocarburo o completa su síntesis de un precursor de hidrocarburo. Alternativamente, los hidrocarburos pueden estar parcial o completamente aislados del material celular antes de la adición de uno o más catalizadores tales como enzimas. Tales

catalizadores son agregados exógenamente y su actividad ocurre al exterior de la célula o *in vitro*.

B. Modificación térmica y otra modificación catalítica

Los hidrocarburos producidos por células *in vivo* o modificados enzimáticamente *in vitro*, como se describe en la presente, pueden ser procesados además opcionalmente mediante medios convencionales. El procesamiento puede incluir "pirolisis catalítica" para reducir el tamaño y así incrementar la composición de hidrógeno:carbono de moléculas de hidrocarburo. Métodos de pirolisis catalítica y térmica son usados sistemáticamente en el procesamiento de hidrocarburos y aceite de triglicéridos. Los métodos catalíticos involucran el uso de un catalizador, tal como un catalizador ácido sólido. El catalizador puede ser sílice-alúmina o una zeolita, que da como resultado un rompimiento heterolítico o asimétrico de un enlace carbono-carbono para dar como resultado un carbocatión y un anión hidruro. Estos intermediarios activos sufren luego ya sea reacomodo o transferencia de hidruro con otro hidrocarburo. Las reacciones pueden así regenerar los intermediarios para dar como resultado un mecanismo de cadena de auto-propagación. Los hidrocarburos pueden también ser procesados para reducir, opcionalmente a cero, el número de dobles, triples enlaces carbono-carbono en los mismos. Los hidrocarburos pueden también ser procesados para remover o eliminar un anillo o estructura

cíclica en los mismos. Los hidrocarburos pueden también ser procesados para incrementar la proporción de hidrógeno:carbono. Esto puede incluir la adición de hidrógeno ("hidrogenación") y/o la "pirolisis catalítica" de hidrocarburos a hidrocarburos más pequeños.

Los métodos térmicos involucran el uso de temperatura y presión elevadas para reducir el tamaño de hidrocarburos. Se pueden usar una temperatura elevada de aproximadamente 800° C y una presión de aproximadamente 700 kPa. Estas condiciones generan "ligero", un término que a veces es usado para referirse a moléculas de hidrocarburo ricas en hidrógeno (tal como son distinguidas del flujo de fotones), en tanto que también generan, mediante condensación, moléculas de hidrocarburo pesadas que están relativamente agotadas de hidrógeno. La metodología proporciona rompimiento homolítico o simétrico y produce alquenos que pueden opcionalmente ser saturados enzimáticamente como se describe anteriormente.

Los métodos catalíticos y térmicos son convencionales en plantas para el procesamiento de hidrocarburos y refinación del petróleo. Así, los hidrocarburos producidos por las células como se describe en la presente pueden ser recolectados y procesados por refinados a través de medios convencionales. Véase Hillen et al. (Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIV: 193-205 (1982)) para un reporte de hidrocraking de hidrocarburos producidos por microalgas. En modalidades

alternativas, la fracción es tratada con otro catalizador, tal como un compuesto orgánico, calor y/o un compuesto inorgánico. Para el procesamiento de lípidos a biodiesel, se usa un proceso de transesterificación como se describe en la Sección IV en la presente.

Los hidrocarburos producidos vía los métodos de la presente invención son útiles en una variedad de aplicaciones industriales. Por ejemplo, la producción de alquilbencensulfonato lineal (LAS), un surfactante aniónico usado en casi todos los tipos de detergentes y preparaciones de limpieza, utiliza hidrocarburos que comprenden en general una cadena de 10-14 átomos de carbono. Véanse, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 6,496,430; 5,506,201; 6,692,730; 6,268,517; 6,020,509; 6,140,302; 5,080,848 y 5,567,359. Surfactantes, tales como LAS, pueden ser usados en la manufactura de composiciones para el cuidado personal y detergentes, tales como aquellos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,942,479; 6,086,903; 5,833,955 y 6,407,044.

VIII. MÉTODOS PARA PRODUCIR COMBUSTIBLES APROPIADOS PARA USO EN VEHÍCULOS A DIESEL Y MOTORES A CHORRO

El interés incrementado es dirigido al uso de componentes de hidrocarburos de origen biológico en combustible, tales como biodiesel, diesel renovable y

combustible de jet, puesto que los materiales biológicos renovables de partida que pueden reemplazar los materiales de partida derivados de combustibles fósiles están disponibles y es deseable el uso de los mismos. Hay una necesidad urgente por métodos para producir componentes de hidrocarburos a partir de materiales biológicos. La presente invención satisface esta necesidad al proveer métodos para la composición de biodiesel, diesel renovable y combustible de jet utilizando los lípidos generados por los métodos descritos en la presente como material biológico para producir biodiesel, diesel renovable y combustible de jet.

Los combustibles de diesel tradicionales son destilados de petróleo ricos en hidrocarburos parafínicos. Tienen intervalos de ebullición tan amplios como de 188° C (370° F) a 415.5° C (780° F), que son apropiados para combustión en un motor de inhibición por compresión, tal como un vehículo de motor a diesel. La Sociedad Estadounidense de Pruebas y Materiales (ASTM por sus siglas en inglés) establece el grado de diesel de acuerdo con el intervalo de ebullición, junto con intervalos permisibles de otras propiedades de combustible, tales como número de cetanos, punto de turbidez, temperatura de inflamación, viscosidad, punto de anilina, contenido de azufre, contenido de agua, contenido de ceniza, corrosión de banda de cobre y residuos de carbono. Técnicamente, cualquier material destilado de hidrocarburos

derivado de biomasa o que cumple de otra manera con la especificación de ASTM apropiada puede ser definido como combustible diesel (ASTM D975), combustible de jet (ASTM D1655) o como biodiesel (ASTM D6751).

Después de la extracción, los componentes de lípido y/o hidrocarburo recuperados de la biomasa microbiana descritos en la presente pueden ser sometidos a tratamiento químico para la manufactura de un combustible para uso en vehículos a diesel y motores a chorro.

A. Biodiesel

El biodiesel es un líquido que varía en color – entre dorado y café oscuro – dependiendo de la materia prima de alimentación de producción. Es prácticamente inmiscible con agua, tiene un alto punto de ebullición y una baja presión de vapor. Biodiesel se refiere a un combustible procesado equivalente a diesel para uso en vehículos de motor a diesel. El biodiesel es biodegradable y no tóxico. Un beneficio adicional del biodiesel con respecto al combustible diesel convencional es un desgaste más bajo del motor.

Comúnmente, el biodiesel comprende alquilésteres de C_{14}-C_{18}. Tales procesos convierten la biomasa o un lípido producido y aislado como se describe en la presente a combustibles de diesel. Un método preferido para producir biodiesel es mediante transesterificación de un lípido como se

describe en la presente. Un alquiléster preferido para uso como biodiesel es un metiléster o etiléster.

El biodiesel producido por un método descrito en la presente puede ser usado solo o combinado con combustible diesel convencional a cualquier concentración en la mayoría de los vehículos de motor a diesel modernos. Cuando es combinado con el combustible diesel convencional (diesel de petróleo), el biodiesel puede estar presente de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 99.9%. A nivel mundial se utiliza un sistema conocido como el factor "B" para afirmar la cantidad de biodiesel en cualquier mezcla de combustible. Por ejemplo, el combustible que contiene 20% de biodiesel es etiquetado como D20. El biodiesel puro es denominado como B100.

El biodiesel puede también ser usado como un combustible de calentamiento en calentadores domésticos y comerciales. Los calentadores o calderas de aceite existentes pueden contener partes de hule o caucho y pueden requerir conversión para funcionar con biodiesel. El proceso de conversión es de manera usual relativamente simple, que involucra el intercambio de partes de hule o caucho por partes sintéticas debido a que el biodiesel es un solvente fuerte. Debido a su fuerte poder de solvente, el quemado de biodiesel incrementará la eficiencia de las calderas o calentadores.

El biodiesel puede ser usado como aditivo en formaciones de diesel para incrementar la lubricidad de

combustible diesel de azufre ultra bajo puro (ULSD), que es ventajoso debido a que no tiene virtualmente ningún contenido de azufre.

El biodiesel es un mejor solvente que el petrodiesel y puede ser usado para romper depósitos de residuos en líneas de combustible de vehículos que han sido previamente puestos en operación con petrodiesel.

1. Producción de biodiesel

El biodiesel puede ser producido mediante transesterificación de triglicéridos contenidos en biomasa rica en aceite. Así, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir biodiesel. En una modalidad preferida, el método para producir biodiesel comprende las etapas de: (a) cultivar un microorganismo que contiene lípido utilizando los métodos revelados en la presente; (b) someter a lisis un microorganismo que contiene lípidos para producir un lisado; (c) aislar el lípido del microorganismo sometido a lisis y (d) transesterificar la composición del lípido, mediante lo cual se produce biodiesel.

Métodos para el cultivo de un microorganismo, someter a lisis un microorganismo para producir un lisado, tratar el lisado en un medio que comprende un solvente orgánico para formar una mezcla heterogénea y recuperar el lisado tratado a una composición de lípido han sido descritos anteriormente y

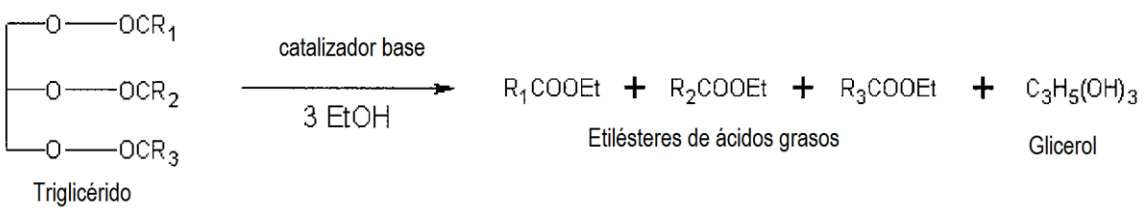
pueden también ser usados en el método para producir biodiesel.

Las composiciones de lípidos pueden ser sometidas a trasesterificación para producir ésteres de ácidos grasos de cadena larga útiles como biodiesel. Las reacciones de transesterificación preferidas son bosquejadas a continuación e incluyen transesterificación catalizada por base y transesterificación utilizando lipasas recombinantes.

En un proceso de transesterificación catalizado por base, los triacilglicéridos se hacen reaccionar con un alcohol, tal como metanol o etanol, en presencia de un catalizador alcalino, comúnmente hidróxido de potasio. Esta reacción forma metil o etilésteres o glicerina (glicerol) como producto secundario.

a) Proceso químico general

Aceites de animales y plantas están compuestos comúnmente de triglicéridos que son ésteres de ácidos grasos libres con el alcohol vinílico, glicerol. En la transesterificación, el glicerol en un triacilglicérido (TAG) es reemplazado con un alcohol de cadena corta tal como metanol o etanol. Un esquema d



En este esquema de reacción, el alcohol es desprotonado con una base para hacerlo un nucleófilo más fuerte. Comúnmente, se usa etanol o metanol en vasto exceso (hasta 50 veces). Normalmente, esta reacción procederá ya sea excesivamente lenta o no. calor, también como un ácido o base pueden ser usados para ayudar a que la reacción proceda más rápidamente. El ácido o base no son consumidos por la reacción de transesterificación, así no son reactivos si no catalizadores. Casi todo el biodiesel ha sido producido utilizando la técnica catalizada por base ya que requiere solamente bajar temperaturas y presiones y producen más de 98% de rendimiento de conversión (a condición de que el agente de partida sea bajo de humedad y ácidos grasos libres).

b. Uso de lipasas recombinantes

La transesterificación también se puede llevar a cabo experimentalmente utilizando una enzima, tal como una lipasa en lugar de una base. La transesterificación lipasa-catalizada se puede llevar a cabo, por ejemplo, a una temperatura de entre la temperatura ambiente y 80° C y una proporción molar de TAG al alcohol inferior mayor que 1:1, preferiblemente alrededor de 3:1.

Lipasas apropiadas para uso en la transesterificación incluyen pero no están limitadas a aquellas enlistadas en la

Tabla 9. Otros ejemplos de lipasas útiles para transesterificación se encuentran por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,798,793; 4,940,845; 5,156,963; 5,342,768; 5,776,741 y WO 89/01032.

Tabla 9. Lipasas apropiadas para uso en transesterificación.

Lipasa ABG73614 de *Aspergillus niger*, lipasa B CAA83122 de *Candida antárctica* (novozym-435), lipasa AAR24090 de *Candida cylindracea*, lipasa de *Candida lipolytica* (Lipasa L; Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), lipasa de *Candida rugosa* (por ejemplo, Lipasa-OF; Meito Sangyo Co., Ltd.), Lipasa de *Mucor mieheik* (Lipozima IM 20), lipasa AAA25882 de *Pseudomonas fluorescens*, lipasa AAAF32408 de *Rhizopus japonicus* (Lipasa F), lipasa ABI13521 de *Serratia marcescens* (Enzima SM), lipasa CAB58509 de *Thermomyces lanuginosa*, Lipasa P (Nagase ChemteX Corporation) y Lipasa QLM (Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya, Japón)

Un reto para usar una lipasa para la producción de ésteres de ácido graso apropiados para biodiesel es que el precio de la lipasa es mucho más alto que el precio del hidróxido de sodio (NaOH) usado por el proceso de base fuerte. Este reto ha sido tratado al utilizar una lipasa inmovilizada, que puede ser reciclada. Sin embargo, la actividad de la lipasa inmovilizada debe ser mantenida después de ser reciclada por un mínimo de ciclos para permitir que un proceso a base de lipasa compita con el proceso de base fuerte en términos de costo de producción. Las lipasas inmovilizadas son sometidas a

envenenamiento por los alcoholes inferiores usados comúnmente en la transesterificación. La Patente Estadounidense No. 6,398,707 (otorgada el 4 de junio de 2002 a Wu et al.) describe métodos para mejora la actividad de lipasas inmovilizadas y regenerar lipasas inmovilizadas que tienen actividad reducida.

En modalidades particulares, una lipasa recombinante es expresada en los mismos microorganismos que producen lípido sobre los cuales la lipasa actúa. Lipasas recombinantes apropiadas incluyen aquellas enlistadas anteriormente en la Tabla 9 y/o que tienen números de acceso de GenBank enlistados anteriormente en la Tabla 9 o un polipéptido que tiene por lo menos 70% de identidad de aminoácidos con una de las lipasas enlistadas anteriormente y en la tabla 9 y que exhibe actividad de lipasa. En modalidades adicionales, la actividad enzimática está presente en una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 99% de identidad con una de las secuencias descritas anteriormente, todas las cuales son incorporadas por referencia en la presente como si se resumieran plenamente. El ADN que codifica la lipasa y marcador seleccionable es preferiblemente cADN codón-optimizado. Métodos para recodificar genes para expresión en microalgas son descritos en la Patente Estadounidense No. 7,135,290.

2. Estándares

El estándar internacional común para biodiesel es EN 14214. D6751 de ASTM es el estándar de biodiesel más común al que se hace referencia en los Estados Unidos de América y Canadá. Alemania usa DIN EN 14214 y el Reino Unido de la Gran Bretaña requiere cumplimiento con BS EN 14214.

Pruebas industriales básicas para determinar si los productos se conforman a estos estándares incluyen comúnmente cromatografía de gases, HPLC y otros. El biodiesel que cumple con los estándares de calidad es muy no tóxico, con una clasificación de toxicidad o toxicidad nominal (LD_{50}) mayor de 50 mL/Kg.

B. Diesel renovable

El diesel renovable comprende alcanos, tales como C16:0 y C18:0 y así, son distinguibles del biodiesel. El diesel renovable de alta calidad se conforma al estándar de D975 de ASTM.

Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima de la invención para producir diesel renovable. Así, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir diesel renovable. El diesel renovable puede ser producido mediante por lo menos tres procesos: procesamiento hidrotérmico

(hidrotratamiento); hidroprocesamiento y licuefacción indirecta. Estos procesos producen destilados sin éster. Durante estos procesos, los triacilglicéridos producidos y aislados como se describe en la presente son convertidos a alcanos.

En una modalidad preferida, el método para producir diesel renovable comprende a) cultivar un microorganismo que contiene lípido utilizando métodos recomendados en la presente; b) someter a lisis el microorganismo para producir un lisado; c) aislar el lípido del microorganismo sometido a lisis y d) desoxigenar e hidrotratar el lípido para producir un alcano, mediante el cual se produce diesel renovable. Lípidos apropiados para la manufactura de diesel renovable pueden ser obtenidos vía extracción de biomasa microbiana utilizando un solvente orgánico tal como hexano o vía otros métodos, tales como aquellos descritos en la patente estadounidense 5, 928, 696.

En algunos métodos el lípido microbiano es primero sometido a pirolisis catalítica en conjunción con hidrotratamiento para reducir la longitud de cadena de carbonos y saturar los dobles enlaces, respectivamente. El material es luego isomerizado, también en conjunción con hidrotratamiento. La fracción de naphta puede luego ser removida por medio de destilación, seguida por destilación adicional para vaporizar y destilar componentes deseados en el combustible diesel para

cumplir con el estándar D975 en tanto que se dejan componentes que son más pesados que los deseados para cumplir con el estándar D975. Los métodos de hidrotratamiento, hidrocracking desoxigenación e isomerización de aceites modificados químicamente, en los que se incluyen aceites de triglicérido, son bien conocidos en el arte. Véanse, por ejemplo solicitudes de patente europeas EP1741768 (A1); EP1741767 (A1); EP1682466 (A1); EP1640437 (A1); EP1681337 (A1); EP1795576 (A1) y patentes estadounidenses 7, 238, 277; 6, 630, 066; 6, 596, 155; 6, 977, 322; 7,041, 866; 6,217, 746; 5, 885, 440; 6, 881, 873.

1. Hidrotratamiento

En una modalidad preferida del método para producir diesel renovable, el tratamiento de lípido para producir un alcano es efectuado mediante hidrotratamiento de la composición de lípido. En el procesamiento hidrotérmico, comúnmente, la biomasa se hace reaccionar en agua a una temperatura y presión elevadas para formar aceites y sólidos residuales. Las temperaturas de conversión son comúnmente de 149°C (300°F) a 349°C (660°F), con presión suficiente para mantener el agua principalmente como líquido, 100 a 170 atmósferas estándar (atm). Los tiempos de reacción son menores de 15 a 30 minutos. Después que la reacción está completa, los orgánicos son separados del agua. Mediante esto, se produce un destilado apropiado para diesel.

2. Hidroprocesamiento

Un diesel renovable, denominado como "diesel verde", puede ser producido a partir de ácidos grasos mediante tecnología de hidroprocesamiento tradicional. Los aceites que contienen triglicérido pueden ser hidroprocesados ya sea como co-alimentación con petróleo o como una alimentación dedicada. El producto es un combustible diesel que se conforma con la especificación D975 de la ASTM. Así, en otra modalidad preferida del método para producir diesel renovable, se efectúa el tratamiento de la composición de lípido para producir un alcano mediante hidroprocesamiento de la composición de lípido.

En algunos métodos para fabricar diesel renovable, la primera etapa de tratamiento de un triglicérido es hidroprocesamiento para saturar dobles enlaces, seguido por desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno y un catalizador. En algunos métodos, la hidrogenación y desoxigenación ocurren en la misma reacción. En otros métodos, la desoxigenación ocurre antes de la hidrogenación. La isomerización es luego efectuada opcionalmente, también en presencia de hidrógeno y un catalizador. Los componentes del naphta son preferentes separados por medio de destilación. Para ejemplo, véanse patentes estadounidenses 5,475,160 (hidrogenización de triglicéridos); 5,091,116 (desoxigenación, hidrogenación y remoción de gas); 6,391,815 (hidrogenación) y

5,888,947 (isomerización).

Los refinadores de petróleo utilizan antiguo procesamiento para remover impurezas mediante tratamiento de alimentaciones con hidrógeno. Las temperaturas de conversión de hidroprocesamiento son comúnmente de 149°C (300°F) a 361°C (700°F). Las presiones son comúnmente de 40 a 100 atmósferas. Los tiempos de reacción son comúnmente del orden de 10 a 60 minutos.

Se usan catalizadores sólidos para incrementar ciertas velocidades de reacción, mejorar la efectividad por ciertos productos y optimizar el consumo de hidrógeno.

El hidrotratamiento e hidroprocesamiento conducen finalmente a una reducción en el peso molecular de la alimentación. En el caso de aceites que contienen triglicérido, la molécula de triglicérido es reducida a cuatro moléculas de hidrocarburos bajo condiciones de hidroprocesamiento: una molécula de propano y tres moléculas de hidrocarburo más pesadas, comúnmente en el intervalo de C_8 a C_{18}.

3. Licuefacción indirecta

Un diesel de ultrabajo contenido de azufre tradicional puede ser producido a partir de cualquier forma de biomasa mediante un proceso de dos etapas. En primer lugar, la biomasa en convertida a un gas sintético, una mezcla gaseosa

rica en hidrógeno y monóxido de carbono. Luego, el gas sintético o gas de síntesis es convertido catalíticamente a líquidos. Comúnmente, la producción de líquidos se lleva a cabo utilizando síntesis de Fischer-Tropsch (FT). Esta tecnología aplica al carbono, gas natural y petróleos pesados. Así, en todavía otra modalidad preferida del método para producir diesel renovable, el tratamiento de la composición de lípido para producir un alcano es efectuado mediante licuefacción indirecta de la composición de lípido.

C. Combustible de jet

El uso anual en los Estados Unidos de América de combustible de jet en 2006 fue de aproximadamente 80 billones de litros (21 billones de galones). El combustible de aeroplano es de color claro a paja. El combustible más común es un combustible a base de aceite sin plomo/parafina clasificado como A-1 de aeroplano, que es producido a un conjunto de especificaciones que están indexadas internacionalmente. El combustible de aeroplano es una mezcla de un gran número de hidrocarburos diferentes, posiblemente tantos como mil o más. El intervalo de sus tamaños (pesos moleculares o números de carbonos) está restringido por los requerimientos por el producto, por ejemplo punto de congelación o punto de humo. El combustible de aeroplano tipo queroseno (en los que se incluyen Jet A y Jet A-1) tiene una distribución de número de carbono de

entre aproximadamente 8 y 16 números de carbono. El combustible de aeroplano de corte amplio o tipo naphta (en los que se incluyen Jet B) tiene comúnmente una distribución de números de carbono de entre a aproximadamente 5 y 15 carbonos.

Ambos combustibles de aeroplano (Jet A y Jet B) pueden contener un número de aditivos. Aditivos útiles incluyen pero no están limitados a antioxidantes, agentes antiestáticos, inhibidores de corrosión y agentes de inhibición de formación de hielo de sistema de combustible (FSII). Los antioxidantes impiden el engomado, y usualmente son a base de fenoles alquilados, por ejemplo AO-30, AO-31 o AO-37. Los agentes antiestáticos disipan la electricidad estática e impiden la formación de chispas. Stadis 450 con ácido dinonilnaphtilsulfónico (DINNSA) como el ingrediente activo, es un ejemplo. Inhibidores de corrosión, por ejemplo DCI-4A es usado para combustibles civiles y militares y DCI-6A es usado para combustibles militares. Agentes de FSII, incluyen por ejemplo Di-EGME.

Una solución es combinar combustibles de algas con combustibles de jet existentes. La presente invención proporciona tal solución. Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima de limitación para producir combustible de jet. Así, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir combustible de jet. Aquí con dos métodos para

producir combustible de jet a partir de los lípidos producidos por los métodos de la presente invención son provistos: cracking catalítica de fluido (FCC) e hidrodesoxigenación (HDO).

1. Cracking catalítico de fluido

El cracking catalítico de fluido (FCC) es un método que es usado para producir olefinas, especialmente propileno a partir de fracciones crudas pesadas. Hay reportes en la literatura que aceites vegetales tales como aceite de canola podrían ser procesados utilizando FCC para dar una corriente de hidrocarburo útil como un combustible de gasolina.

Los lípidos producidos por el método de la presente invención pueden ser convertidos a olefinas. El proceso involucra hacer fluir los lípidos producidos a través de una FCC y localizar una corriente de productos que consiste de olefinas, que es útil como combustible de jet. Los lípidos producidos son puestos en contacto con un catalizador de cracking a condiciones de cracking para proveer una corriente de productos que comprende olefinas e hidrocarburos útiles como combustible de jet.

En una modalidad preferida, el método para producir combustible de jet comprende: a) cultivar un microorganismo que contiene lípidos utilizando métodos revelados en la presente, b) someter a lisis el microorganismo que contiene lípidos para

producir un lisado, c) aislar el lípido del lisado y d)tratar la composición del lípido, mediante lo cual se produce el combustible de jet.

En una modalidad preferida del método para producir un combustible de jet, la composición de lípido se puede hacer fluir a través de una zona de cracking catalítica de fluido, en una modalidad, puede comprender poner en contacto la composición de lípido con un catalizador de cracking a condiciones de cracking para proveer una corriente de productos que comprende C_2 - C_5 olefinas.

En ciertas modalidades de este método puede ser deseable remover cualesquier contaminantes que pueden estar presentes en la composición de lípido. Así, antes de hacer fluir la composición de lípido a través de una zona de cracking catalítica de fluido, la composición de lípido es pre-tratada. El pre-tratamiento puede involucrar poner en contacto la composición del lípido con una resina de intercambio iónico. La resina de intercambio iónico es una resina de intercambio iónico ácida, tal como Amberlyst™-15 y pude ser usada como lecho en un reactor a través del cual la composición de lípidos se hace fluir, ya sea flujo hacia arriba o flujo hacia abajo. Otros pre-tratamientos pueden influir lavados ácidos suaves al poner en contacto la composición del lípido con un ácido, tal como ácido sulfúrico, acético, nítrico o clorhídrico. El contacto se hace con una solución de ácido diluida, usualmente

a temperatura ambiente y presión atmosférica.

La composición del lípido, opcionalmente pre-tratada, se hace fluir a una zona de FCC, en donde los componentes hidrocarbonaceos son sometidos a cracking a olefinas. El cracking catalítico se lleva a cabo al poner en contacto la composición de lípido en una zona de reacción con un catalizador compuesto de material en partículas finamente divididas. La reacción es cracking catalítica, en contraposición con hidrocracking y se lleva a cabo en ausencia de hidrógeno agregado o el consumo de hidrógeno. A medida que la reacción de cracking procede, cantidades sustanciales de coked son depositadas sobre el catalizador. El catalizador es regenerado a alta temperatura al quemar el coked del catalizador en una zona de regeneración. El catalizador que contiene el coked, denominado en la presente como "catalizador con coked", es transportado continuamente de la zona de reacción a la zona de regeneración para ser regenerado y reemplazado por el catalizador regenerado esencialmente libre de coked de la zona de regeneración. La fluidización de las partículas catalíticas mediante varias corrientes gaseosas permiten el transporte de catalizador entre la zona de reacción y la zona de regeneración. Métodos para el cracking de hidrocarburos, tales como aquellos de la composición de lípido descritos en la presente, en una corriente fluidizada de catalizador, transportar el catalizador entre las zonas de

reacción y regeneración y someter a combustible de coked en el regenerador son bien conocidos para aquellos experimentados en el arte de procesos de FCC. Aplicaciones de FCC ejemplares y catalizadores útiles para el cracking de la composición del lípido para producir C_2 – C_5 olefinas son descritos en las patentes estadounidenses 6, 538, 169; 7, 288, 685, que son incorporadas en su calidad por referencia.

En una modalidad, el cracking de la composición del lípido de la presente invención es madurar en la sección de elevador o alternativamente, la sección elevada de la zona de FCC. La composición del lípido es introducida al elevador mediante una boquilla dando como resultado la vaporización rápida de la composición de lípido. Antes de ponerse en contacto con el catalizador, la composición de lípido tendrá ordinariamente una temperatura de aproximadamente 149°C (300°F) a aproximadamente 316°C (600°F). El catalizador se hace fluir desde un recipiente mezclador al elevador, en donde se pone en contacto con la composición de lípido por un tiempo de aproximadamente dos segundos o menos.

El catalizador mezclado y los vapores de la composición de lípido que reaccionaron son luego descargados de lo alto del elevador a través de una salida y separados a una corriente de vapor producto crackeada que incluye olefinas y una conexión de partículas catalíticas cubiertas con cantidades sustanciales de coked y denominadas en general como

"catalizador con coked". En un esfuerzo por minimizar el tiempo de contacto de la composición de lípido y el catalizador que puede promover la composición adicional de los productos deseados a otros productos indeseables, cualquier arreglo de separadores tales como un arreglo de brazo de remolino pueden ser usados para remover el catalizador con coked de la corriente del producto rápidamente. El separador, por ejemplo, separador del brazo de remolino, está ubicado en una porción superior de una cámara con una zona de separación situada en la porción inferior de la cámara. El catalizador separado por el arreglo de brazo de remolino cae a la zona de separación. La corriente de vapor de producto crackeado que comprende hidrocarburos crackeados que incluyen olefinas ligeras y algo de catalizador salen de la cámara vía un conducto que está en comunicación con ciclones. Los ciclones remueven las partículas de catalizador restantes de la corriente de vapor de producto para reducir las concentraciones de partículas a niveles muy bajos. Luego, la corriente de vapor producto sale de lo alto del recipiente de separación. El catalizador separado por los ciclones es devuelto al recipiente de separación y luego a la zona de separación. La zona de separación remueve los hidrocarburos absorbidos de la superficie del catalizador mediante contacto a contracorriente con vapor saturado.

La presión parcial baja de hidrocarburo opera para favorecer la producción de olefina ligera. Así, la presión del

elevador es ajustada a aproximadamente 172 a 241 KPa (25 a 35 libras fuerza/pulgada^2) con una presión parcial de hidrocarburo de aproximadamente 35 a 172 KPa (5 a 25 libras fuerza/pulgada^2), con una presión parcial preferida de aproximadamente 69 a 138 KPa (10 a 20 libras fuerza/pulgada^2). Esta presión parcial relativamente baja para hidrocarburos es obtenida al usar vapor como diluyente a la extensión que el diluyente es de 10 a 55% en peso de la composición de lípido y preferiblemente alrededor de 15% en peso de la composición del lípido. Otros diluyentes tales como gas seco pueden ser usados para llegar a presiones parciales de hidrocarburo equivalentes.

La temperatura de la corriente sometida a cracking en la salida del elevador será de aproximadamente 510°C a 621°C (950°F a 1150°F). Sin embargo, las temperaturas de salida del elevador mayores de 566°C (1050°F) hacen más gas seco y más olefinas. Mientras que las temperaturas de salida del elevador menores de 566°C (1050°F) hacen menos etileno y propileno. Así, es preferido poner en operación el proceso de FCC a una temperatura preferida de aproximadamente 566°C a aproximadamente 630°C, una presión preferida de aproximadamente 138 kPa a aproximadamente 240 kPa (20 a 35 libras-fuerza/pulg^2 absolutas). Otra condición para el proceso es que la proporción de la composición de catalizador a lípido que puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 y preferiblemente de alrededor de 10 a aproximadamente 15.

En una modalidad del método para producir un combustible de jet, la composición de lípido es introducida en la sección de elevador de un reactor de FCC. La temperatura en la sección de elevador será muy caliente y fluctuará de aproximadamente 700°C (1292°F) a aproximadamente 760°C (1400°F) con una proporción de catalizador a composición de lípido de aproximadamente 100 a aproximadamente 150. Se anticipa que al introducir la composición del lípido a la sección de elevador producirá cantidades considerables de propileno y etileno.

Los productos de gas e hidrocarburo líquidos producidos pueden ser analizados mediante cromatografía de gases, HPLC, etc.

2. Hidrodesoxigenación

En otra modalidad del método para producir un combustible de jet utilizando la composición de lípido o los lípidos producidos como se describe en la presente, la estructura de la composición de lípido o los lípidos es descompuesta mediante un proceso denominado como hidrodesoxigenación (HDO).

HDO significa la remoción de oxígeno por medio de hidrógeno, esto es, el oxígeno es removido en tanto que se rompe la estructura del material. Los dobles enlaces olefínicos son hidrogenados y cualesquier compuestos de azufre y nitrógeno son removidos. La remoción de azufre es llamada

hidrodesulfurización (HDS). El pre-tratamiento y pureza de las materias primas (composición de lípido o los lípidos) contribuyen a la vi de servicio del catalizador.

En general en la etapa de HDO/HDS, el hidrógeno es mezclado con la materia prima de alimentación (composición de lípido o los lípidos) y luego la mezcla se hace pasar a través de un lecho catalítico como un flujo a co-corriente, ya sea como una sola fase o como una materia prima de alimentación de dos fases. Después de la etapa de HDO/MDS, la fracción de producto es separada y se hace pasar a un reactor de isomerización separado. Un reactor de isomerización para el material de partida biológico es descrito en la literatura (FI 100 248) como un reactor a co-corriente.

El proceso para producir un combustible mediante hidrogenación de una alimentación de hidrocarburo, por ejemplo, la composición de lípido o los lípidos en la presente, puede también ser efectuado al hacer pasar la composición de lípido o los lípidos como un flujo a co-corriente con gas hidrógeno a través de una primera zona de hidrogenación y después de esto, el afluente de hidrocarburo es hidrogenado adicionalmente en una segunda zona de hidrogenación al hacer pasar el gas hidrógeno a la segunda zona de hidrogenación como un flujo a contra-corriente en relación con el efluente de hidrocarburo. Aplicaciones de HDO ejemplares y catalizadores útiles para el cracking de la composición de lípido para producir C_2-C_5

olefinas son descritos en la patente estadounidense No. 7,232,935, que es incorporada en su totalidad por referencia.

Comúnmente, en la etapa de hidrodesoxigenación, la estructura del componente biológico, tal como la composición de lípido o lípidos en la presente, es descompuesta, el oxígeno, nitrógeno, fósforo y compuestos de azufre e hidrocarburos ligeros como gas son removidos y los enlaces olefínicos son hidrogenados. En la segunda etapa del proceso, esto es, en la llamada etapa de isomerización, la isomerización se lleva a cabo para la ramificación de la cadena de hidrocarburos y para mejorar el desempeño de la parafina a bajas temperaturas.

En la primera etapa, esto es, la etapa de HDO del proceso de cracking, el gas de hidrógeno y la composición de lípido o lípidos en la presente que van a ser hidrogenados se hacen pasar a un sistema de lecho catalítico de HDO ya sea como flujos a co-corriente o a contra-corriente, el sistema de lecho catalítico comprende uno o más lechos catalítico, preferiblemente 1-3 lechos catalíticos. La etapa de HDO se pone en operación comúnmente en una manera a co-corriente. En el caso de un sistema de lecho catalítico de HDO que comprende dos o más lechos catalíticos, uno o más de los lechos se pueden poner en operación utilizando el principio de flujo a contra-corriente.

En la etapa de HDO, la presión varía entre 20 y 150 bars, preferiblemente entre 50 y 100 bars y la temperatura

varía entre 200 y 500°C, preferiblemente en el intervalo de 300-400°C.

En la etapa de HDO, catalizadores de hidrogenación conocidos que contienen metales del Grupo VII y/o VIB del sistema periódico pueden ser usados. Preferiblemente, los catalizadores de hidrogenación son catalizadores de Pd, Pt, Ni, NiMo o CoMo soportados, el soporte consiste de alúmina y/o sílice. Comúnmente, se usan catalizadores de $NiMo/Al_2O_3$ y $CoMo/Al_2O_3$.

Antes de la etapa de HDO, la composición de lípido o lípidos en la presente pueden opcionalmente ser tratados mediante pre-hidrogenación bajo condiciones más suaves, evitando así reacciones secundarias de los dobles enlaces. Tal pre-hidrogenación se lleva a cabo en presencia de un catalizador de pre-hidrogenación a temperaturas de 50-400°C y a presiones de hidrógeno de 1-200 bars, preferiblemente a una temperatura de entre 150 y 250°C y una presión de hidrógeno de entre 10 y 100 bars. El catalizador puede contener metales del Grupo VIII y/o VIB del sistema periódico. Preferiblemente, el catalizador de pre-hidrogenación es un catalizador de Pd, Pt, Ni, NiMo y CoMo soportado, el soporte consiste de alúmina y/o sílice.

Una corriente gaseosa de la etapa de HDO que contiene hidrógeno es enfriada y luego el monóxido de carbono, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y compuestos de azufre,

hidrocarburos ligeros gaseosos y otras impurezas son removidos en la misma. Después de la compresión, el hidrógeno purificado o hidrógeno reciclado es devuelto al primer lecho catalítico y/o entre los lechos catalíticos para compensar la extracción de la corriente de gas. El agua es removida del líquido condensado. El líquido se hace pasar al primer lecho catalítico o entre los lechos catalíticos.

Después de la etapa de HDO, el producto es sometido a una etapa de isomerización. Es sustancial para el proceso que las impurezas sean removidas tan completamente como sea posible antes de que los hidrocarburos se pongan en contacto con el catalizador de isomerización. La etapa de isomerización comprende una etapa de separación opcional, en donde el producto de reacción de la etapa HDO puede ser purificado mediante separación o destilación con vapor de agua o un gas apropiado tal como hidrocarburo ligero, nitrógeno o hidrógeno. La etapa de destilación o separación opcional se lleva a cabo a manera a contra-corriente en una unidad corriente arriba del catalizador de isomerización, en donde el gas y líquido se ponen en contacto entre sí o antes del reactor de isomerización real en una unidad de separación separada que utiliza el principio a contra-corriente.

Después de la etapa de separación en gas hidrógeno y la composición de lípido hidrogenada o lípidos en la presente y opcionalmente una mezcla de n-parafina, se hacen pasar a una

unidad de isomerización reactiva que comprende uno o varios lechos catalíticos. Los lechos catalíticos de la etapa de isomerización pueden operar ya sea en una manera a co-corriente o a contra-corriente.

Es importante para el proceso que el principio de flujo a contra-corriente sea aplicado en la etapa de isomerización. En la etapa de isomerización. Esto se hace al llevar a cabo ya sea la etapa de separación opcional o la etapa de reacción de isomerización o ambas a manera a contra-corriente.

La etapa de isomerización y la etapa de HDO se pueden llevar a cabo en el mismo recipiente a presión o en recipientes a presión separados. La pre-hidrogenación opcional se puede llevar a cabo en un recipiente a presión separado o en el mismo recipiente a presión como las etapas de HDO e isomerización.

En la etapa de isomerización, la presión varía en el intervalo de 20-150 bars, preferiblemente en el intervalo de 20-100 bars, la temperatura es de entre 200 y 500°C, preferiblemente entre 300 y 400°C.

En la etapa de isomerización, se puede usar catalizadores de isomerización conocidos en el arte. Catalizadores de isomerización apropiados contienen tamices moleculares y/o un metal del Grupo VII y/o un portador. Preferiblemente, el catalizador de isomerización contiene SAPO-11 o SAPO41 o ZSM-22 o ZSM-23 o ferrierita y Pt, Pd o Ni y

Al_2O_3 i SiO_2. Catalizadores de isomerización típicos son por ejemplo Pt/SAPO-11/Al_2O_3, Pt/ZSM-22/Al_2O_3, Pt/ZSM-23/Al_2O_3 y Pt/SAPO-11l/SiO_2.

En cuanto al producto, un componente de hidrocarburo de alta calidad de origen biológico, útil como un combustible de diesel o un componente del mismo, es obtenido, la densidad, número de cetano y desempeño a baja temperatura de dicho componente de hidrógeno son excelentes.

IX. DISEÑO DE MICROBIO

Como se indica anteriormente, en ciertas modalidades de la presente invención, es deseable modificar genéticamente un microorganismo para mejorar la producción de lípido, modificar las propiedades o proporciones de componentes generados por el microorganismo o mejorar o proveer las características de crecimiento de novo sobre una variedad de materias primas de alimentación. *Chlorella*, particularmente *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.* y *Chlorella emersonii* son microorganismos preferidos para uso en los métodos de diseño genéticos descritos en la presente, aunque otras especies de *Chlorella* también como otras variedades de microorganismos pueden ser usados.

Promotores, cADN y 3'UTR, también como otros elementos de los vectores, pueden ser generados por medio de técnicas de clonación utilizando fragmentos aislados de fuentes

naturales (véase por ejemplo *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al. (3d edición, 2001, Cold Spring Harbor Press; y patente estadounidense 4,683,202). Alternativamente, se pueden generar elementos sintéticamente utilizando métodos conocidos (véase por ejemplo Gene. 1995 Oct 16; 164(l):49-53).

A. Optimización de Codón para la Expresión

ADN que codifica un polipéptido a ser expresado en un microorganismo, por ejemplo, una lipasa y marcador seleccionable son preferiblemente cADN codón-optimizados. Métodos para recodificar genes para expresión en microalgas son descritos en la patente estadounidense 7,135,290. Información adicional para la optimización de codón está disponible, por ejemplo, en la base de datos de uso de codón de GenBank. Como ejemplos no limitantes, el uso de codón en *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella* salina y *Chlorella protothecoides* son mostrados en las Tablas 10, 11 y 12, respectivamente.

Tabla 10. Uso de codón *Chlorella pyrenoidosa*.

Phe	UUU	39 (0.82)	Ser	UCU	50 (1.04)
	UUC	56 (1.18)		UCC	60 (1.25)
Leu	UUA	10 (0.20)		UCA	6 (0.96)
	UUG	46 (0.91)		UCG	43 (0.89)
Tyr	UAU	15 (0.59)	Cys	UGU	46 (0.77)
	UAC	36 (1.41)		UGC	73 (1.23)
ter	UAA	9 (0.00)	ter	UGA	43 (0.00)
ter	UAG	15 (0.00)	Trp	UGG	69 (1.00)
Leu	CUU	49 (0.97)	Pro	CCU	80 (0.98)
CUC		73 (1.45)	CCC		88 (1.08)
	CUA	22 (0.44)		CCA	93 (1.14)
	CUG	103 (2.04)		CCG	65 (0.80)
His	CAU	50 (0.88)	Arg	CGU	39 (0.76)
	CAC	3 (1.12)		CGC	63 (1.23)
Gln	CAA	59 (0.84)		CGA	46 (0.90)
	CAG	2 (1.16)		CGG	47 (0.92)
Ile	AUU	24 (0.69)	Thr	ACU	32 (0.67)
	ABC	61 (1.76)		ACC	76 (1.60)
	AUA	19 (0.55)		ACA	41 (0.86)
Met	AUG	42 (1.00)		ACG	41 (0.86)
Asn	AAU	26 (0.75)	Ser	AGU	23 (0.48)
	AAC	3 (1.25)		AGC	67 (1.39)
Lys	AAA	32 (0.54)	Arg	AGA	51 (1.00)
	AAG	86 (1.46)		AGG	61 (1.19)

Val	GUU	36 (0.75)		Ala	GCU	57 (0.79)	
	GUC	54 (1.13)			GCC	97 (1.34)	
	GUA	30 (0.63)			GCA	89 (1.23)	
	GUG	71 (1.49)			GCG	47 (0.65)	
Asp	GAU	60 (0.95)		Gly	GGU	35 (0.60)	
	GAC	66 (1.05)			GGC	78 (1.33)	
Glu	GAA	41 (0.68)			GGA	54 (0.92)	
	GAG	80 (1.32)			GGG	67 (1.15)	

Tabla 11. Uso de codón preferido en *Dunaliella salina*.

TTC (Phe)	TAC (Tyr)	TGC (Cys)	TAA (Stop)
TGG (Trp)	CCC (Pro)	CAC (His)	CGC (Arg)
CTG (Leu)	CAG (Gln)	ATC (Ile)	ACC (Thr)
AAC (Asn)	AGC (Ser)	ATG (Met)	AAG (Lys)
GCC (Ala)	GAC (Asp)	GGC (Gly)	GTG (Val)
GAG (Glu)			

Tabla 12. Uso de codón preferido en *Chlorella protothecoides*.

TTC (Phe)	TAC (Tyr)	TGC (Cys)	TGA (Stop)
TGG (Trp)	CCC (Pro)	CAC (His)	CGC (Arg)
CTG (Leu)	CAG (Gln)	ATC (Ile)	ACC (Thr)
GAC (Asp)	TCC (Ser)	ATG (Met)	AAG (Lys)
GCC (Ala)	AAC (Asn)	GGC (Gly)	GTG (Val)

GAG (Glu)

B. Promotores

Muchos promotores son activos en microalgas, en los que se incluyen promotores que son endógenos a las algas que son transformadas, también como promotores que no son endógenos a las algas que son transformadas (esto es, promotores de otras algas, promotores de plantas superiores y promotores de virus de plantas o virus de algas). Promotores exógenos y/o endógenos que son activos en microalgas y genes de resistencia a antibiótico funcionales en microalgas son descritos por ejemplo, Curr Microbiol. 1997 Dic; 35(6):356-62 (*Chlorella vulgaris*); Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene; 4(l):63-73 (*Chlorella ellipsoidea*); Mol Gen Genet. 1996 Oct 16; 252(5):572-9 (Phaeodactylum tricornutum); Plant Mol Biol. 1996 Abr; 31(1):1-12 (Volvox carteri); Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 22;91 (24): 11562-6 (Volvox carteri); Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C, PMID: 10383998, 1999 May; l(3):239-251 (Laboratory of Molecular Plant Biology, Stazione Zoologica, Villa Comunale, 1-80121 Napoles, Italia) (Phaeodactylum tricornutum y Thalassiosira weissflogii); Plant Physiol. 2002 May; 129(l):7-12. (Porphyridium sp.); Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Ene 21;100(2):438-42. (Chlamydomonas reinhardtii); Proc Natl Acad Sci USA. 1990 Feb; 87(3): 1228-32. (Chlamydomonas reinhardtii); Nucleic Acids Res. 1992 Ene

25;20(12):2959-65; Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene; 4(l):63-73 (*Chlorella*); Biochem Mol Biol Int. 1995 Ago; 36(5): 1025-35 (Chlamydomonas reinhardtii); J Microbiol. 2005 Ago; 43(4):361-5 (Dunaliella); Yi Chuan Xue Bao. 2005 Abr; 32(4):424-33 (Dunaliella); Mar Biotechnol (NY). 1999 May; 1(3):239-251. (Thalassiosira y Phaedactylum); Koksharova, *Appl Microbiol Biotechnol* 2002 Feb; 58(2): 123-37 (varias especies); Mol Genet Genomics. 2004 Feb; 271(l):50-9 (Thermosynechococcus elongates); J. Bacterid. (2000), 182, 211-215; FEMS Microbiol Lett. 2003 Abr 25; 221(2):155-9; Planta Physiol. 1994 Jun; 105(2):635-41; Plant Mol Biol. 1995 Dic; 29(5):897-907 (Synechococcus PCC 7942); Mar Pollut Bull. 2002; 45(1-12):163-7 (Anabaena PCC 7120); Proc Natl Acad Sci USA. 1984 Mar; 81(5):1561-5 (Anabaena (varias cepas)); Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Mar 27; 98(7):4243-8 (Synechocystis); Wirth, Mol Gen Genet 1989 Mar; 216(l):175-7 (varias especies); Mol Microbiol, 2002 Jun; 44(6): 1517-31 y Plasmid, 1993 Sep; 30(2):90-105 (Fremyella diplosiphon); Hall et al. (1993) Gene 124: 75-81 (Chlamydomonas reinhardtii); Gruber et al. (1991). Current Micro. 22: 15-20; Jarvis et al. (1991) Current Genet. 19: 317-322 (Chlorella); para promotores adicionales véase también Tabla 1 de la patente estadounidense 6,027,900).

El promotor usado para expresar un gen exógeno puede ser el promotor enlazado naturalmente a aquel gen o puede ser un gen heterólogo. Algunos promotores son activos en más de una

especie de microalgas. Otros promotores son específicos de la especie. Promotores preferidos incluyen promotores tales como RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtiik* y promotores virales, tales como virus de mosaico de coliflor (CMV) y virus de *Chlorella*, que han mostrado ser activos en múltiples especies de microalgas (véase por ejemplo Plant Cell Rep. 2005 Mar; 23(10-11):727-35; J Microbiol. 2005 Ago; 43(4):361-5; Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene; 4(1):63-73). En otras modalidades, el promotor de malato deshidrogenasa *Botryococcus*, tal como un ácido nucleico que comprende cualquier parte de SEQ ID NO: 3 o el promotor RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtiik* (SEQ ID NO: 4) pueden ser usados. Opcionalmente, por lo menos 10, 20, 30, 40, 50 o 60 nucleótidos o más de estas secuencias que contienen un promotor son usados. Promotores preferidos endógenos a especies del género *Chlorella* son SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Promotores preferidos útiles para expresión de genes exógenos en *Chlorella* son enlistadas en el listado de secuencias de esta solicitud, tal como el promotor del gen HUP1 de *Chlorella* (SEQ ID NO: 1) y el promotor de nitrato reductasa de *Chlorella ellipsoidea* (SEQ ID NO: 2). Promotores de virus de *Chlorella* pueden también ser usados para expresar genes en *Chlorella*, tales como SEQ ID NO: 1-7 de la patente estadounidense 6,395,965. Promotores adicionales activos en *Chlorella* pueden ser encontrados, por ejemplo en Biochem Biophys Res Commun. 1994 Oct 14; 204(l): 187-94; Plant Mol

Biol. 1994 Oct; 26(l):85-93; Virology. 2004 Ago 15; 326(l):150-9; y Virology. 2004 Ene 5; 318(l):214-23.

C. Marcadores Seleccionables

Cualquiera de una amplia variedad de marcadores seleccionables pueden ser empleados en un constructo de transgen útil para transformar *Chlorella*. Ejemplos de marcadores seleccionables apropiados incluyen el gen de nitrato reductasa, el gen de higromicina fosfotransferasa (HPT), el gen de neomicina fosfotransferasa y el gen ble, que confiere resistencia a fleomicina. Métodos para determinar la sensibilidad de microalgas a antibióticos son bien conocidos. Por ejemplo, Mol Gen Genet. 1996 Oct 16; 252(5):572-9.

Más específicamente, Dawson et al. (1997), Current Microbiology 35:356-362 (incorporada por referencia en la presente en su totalidad), describen el uso del gen de nitrato reductasa (NR) de *Chlorella vulgaris* como marcador seleccionable para mutantes de *Chlorella sorokiniana* NR-deficientes. Kim et al. (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73 (incorporada por referencia en la presente en su totalidad), revelaron el uso del gen de HPT como marcador seleccionable para transformar *Chorella ellipsoidea*. Huang et al. (2007), Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 197-205 (incorporada por referencia en la presente en su totalidad), reportaron el uso de ble de Sh como marcador seleccionable para *Chlorella sp*. DT.

D. <u>Expresión Inducible</u>

La presente invención también proporciona el uso de un promotor inducible para expresar un gen de interés. En particular, el uso de un promotor inducible para expresar un gen de lipasa permite la producción de lipasa después del crecimiento del microorganismo cuando las condiciones han sido ajustadas, si es necesario, para mejorar la transesterificación, por ejemplo, después de la disrupción de las células, reducción del contenido de agua de la mezcla de reacción, y/o adición de alcohol suficiente para impulsar la conversión de TAG a ésteres de ácido graso.

Promotores inducibles útiles en la invención incluyen aquellos que moderan la transcripción de un gen enlazado operativamente en respuesta a un estímulo, tal como una molécula pequeña provista exógenamente (por ejemplo, glucosa, como en SEQ ID NO: 1), temperatura (calor o frío), luz, etc. Promotores apropiados pueden activar la transcripción de un gen esencialmente silente o regular hacia arriba, de preferencia sustancialmente, la transcripción de un gen enlazado operativamente que es transcrito a un bajo nivel. En el último caso, el nivel de transcripción de la lipasa preferiblemente no interfiere significativamente con el crecimiento del microorganismo en el cual es expresado.

La expresión de transgenes en *Chlorella* puede ser

efectuada indeciblemente por medio de promotores tales como el promotor que impulsa el gen transportador de hexosa de *Chlorella* (SEQ ID NO: 1). Este promotor es fuertemente activado por la presencia de glucosa en el medio de cultivo.

E. Expresión de dos o más genes exógenos

Además, un microorganismo diseñado genéticamente, tal como una microalga, puede comprender y expresar dos o más genes exógenos, tales como por ejemplo, una lipasa y un gen litico, por ejemplo uno que codifica una enzima polisacárido-degradante. Uno o ambos genes pueden ser expresados utilizando un promotor inducible, lo que permite la temporización relativa de expresión de expresión de estos genes sea controlada para mejorar el rendimiento de lípido y conversión a ésteres de ácido graso. La expresión de los dos o más genes exógenos puede estar bajo el control del mismo promotor inducible o bajo el control de promotores inducibles diferentes. En la última situación, la expresión de un primer gen exógeno puede ser inducida por un primer período de tiempo (durante el cual la expresión de un segundo gen exógeno puede o puede no ser inducida) y la expresión de un segundo gen exógeno puede ser inducida por un segundo período de tiempo (durante el cual la expresión de un primer gen exógeno puede o puede no ser inducida). Se proporcionan en la presente vectores y métodos para diseñar microbios que producen lípidos para metabolizar

sacarosa, que es un rasgo ventajoso debido a que permite que las células diseñadas conviertan materia prima de alimentación de caña de azúcar a lípidos.

También se proporcionan en la presente cepas diseñadas genéticamente de microbios (por ejemplo, microalgas, levadura oleaginosa, bacterias u hongos) que expresan dos o más genes exógenos, tales como por ejemplo, una acil-ACP tioesterasa grasa y una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, la acción combinada de las cuales produce un producto de alcohol. Se proporciona además otras combinaciones de genes exógenos, en los que se incluyen sin limitación, una acil-ACP tioesterasa grasa y una acil-CoA reductasa grasa para generar aldehídos. Además, la presente solicitud proporciona la combinación de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa y un aldehído decarboxilasa grasa para generar alcanos. Uno o más de los genes exógenos pueden ser expresados utilizando un promotor inducible.

Ejemplos de modificaciones además apropiadas para uso en la presente invención incluyen cepas diseñadas genéticamente de microalgas para expresar dos o más genes exógenos, uno que codifica un transportador de una fuente de carbono fija (tal como sacarosa) y un segundo que codifica una enzima de invertasa sacarosa. Los organismos fermentables resultantes producen hidrocarburos a un costo de manufactura más bajo que aquel que ha sido obtenible mediante métodos previamente

conocidos de producción de hidrocarburos biológicos. La inserción de los dos genes exógenos descrita en la presente puede ser combinada con la disrupción de biosíntesis de polisacáridos por medio de mutagénesis directa y/o aleatoria, que dirige el flujo de carbono aun mayor a la producción de hidrógeno. Individualmente y en combinación, la conversión trófica, diseño para alterar la producción de hidrocarburo y tratamiento con enzimas exógenas alteran la composición de hidrocarburo producida por un microorganismo. La alteración puede ser un cambio en la cantidad de hidrógenos producidos, la cantidad de una o más especies de hidrocarburos producidas en relación con otros hidrocarburos y/o los tipos de especies de hidrocarburo producidos en el microorganismo. Por ejemplo, las microalgas pueden ser diseñadas para producir una cantidad más alta y/o porcentaje más alto de TAG.

F. <u>Expresión por Compartimientos</u>

La presente invención también proporciona la expresión por compartimientos de un gen de interés. En particular, puede ser ventajoso en modalidades particulares, apuntar la expresión de la lipasa a uno o más compartimientos celulares, en donde es secuestrada de la mayoría de lípidos celulares hasta el inicio de la reacción de transesterificación. Organelos preferidos para apuntamiento son cloroplastos, mitocondria y retículo endoplásmico.

1. Expresión en Cloroplastos

En una modalidad de la presente invención, la expresión de un polipéptido en un microorganismo es apuntada a cloroplastos. Métodos para el apuntamiento de la expresión de un gen heterólogo al cloroplasto son conocidos y pueden ser empleados en la presente invención. Métodos para apuntamiento de productos genéticos extraños a cloroplastos son descritos en Shrier et al., EMBO J. (1985) 4:25 32. Véase también Tomai et al. Gen. Biol. Chem. (1988) 263:15104 15109 y patente estadounidense No. 4,940,835 para el uso de péptidos de tránsito para translocar productos genéticos nucleares al cloroplasto. Métodos para dirigir el transporte de proteínas al cloroplasto son también revisados en Kenauf TIBTECH (1987) 5:40 47. Secuencias de apuntamiento de cloroplasto endógenas a *Chlorella* son conocidas, tales como genes en el genoma nuclear de *Chlorella* que codifican proteínas que son apuntadas al cloroplasto; véase por ejemplo número de acceso GenBank AY646197 y AF499684.

Wageningen UR - Plant Research International vende un vector IMPACTVECTOR1.4, que usa la señal de secreción de la proteína de subunidad pequeña de Chrysanthemum morifolium para administrar una proteína heteróloga al medio ambiente de estroma de cloroplasto (citoplásmico), lanzándose a través de un sistema de doble membrana. La proteína es fusionada a los

primeros 11 aminoácidos de las proteína de rubisco madura con el fin de permitir el procesamiento apropiado del péptido de señal (Wong et al., Plant Molecular Biology 20: 81-93 (1992)). El péptido de señal contiene un intrón natural del ge RbcS.

En otro procedimiento, el genoma de cloroplasto es diseñado genéticamente para expresar la proteína heteróloga. Se ha descrito la transformación estable de cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtiik* (una alga verde) utilizando bombardeo de células receptoras con micro-proyectiles de tungsteno de alta velocidad recubiertos con ADN extraño. Véase, por ejemplo, Boynton et al., Science (1988) 240: 1534 1538; Blowers et al. Plant Cell (1989) 1:123 132 y Debuchy et al., EMBO J. (1989) 8: 2803 2809. La técnica de transformación utilizando micro-proyectiles de tungsteno es descrita por Klein et al., Nature (Londres) (1987) 7:70 73. Otros métodos de transformación de cloroplasto tanto para plantas como microalgas son conocidos. Véanse, por ejemplo patentes estadounidenses 5,693,507; 6,680,426; y Plant Physiol. 2002 mayo; 129(l):7-12; y Plant Biotechnol J. 2007 mayo; 5(3):402-12.

Como se describe en patente estadounidense No. 6,320,101 (expedida el 20 de noviembre de 2001 a Kaplan et al.; que es incorporado en la presente por referencia), las células pueden ser tratadas químicamente para reducir el número de cloroplastos por célula a aproximadamente uno. Luego, el ácido

nucleico heterólogo puede ser introducido a las células vía bombardeo de partículas el objetivo de introducir por lo menos una molécula de ácido nucleico heteróloga a los cloroplastos. El ácido nucleico heterólogo es seleccionado de tal manera que es integrable al genoma del cloroplasto vía recombinación homóloga que es fácilmente efectuada por enzimas inherentes al cloroplasto. Para este fin, el ácido nucleico heterólogo incluye, además de un gen de interés, por lo menos una secuencia de ácido nucleico que es derivada del genoma del cloroplasto. Además, el ácido nucleico heterólogo incluye un marcador seleccionable. Detalles adicionales con respecto a esta técnica se encuentra en las patentes estadounidenses. Nos. 4,945,050 y 5,693,507 que son incorporadas en la presente por referencia. Un polipéptido puede así ser producido por el sistema de expresión de proteína del cloroplasto.

La patente estadounidense No. 7,135,620 (expedida el 14 de noviembre de 2006 a Daniell et al.; incorporada en la presente por referencia) describe vectores de expresión de cloroplasto y métodos relacionados. Los casets de expresión son constructos de ADN que incluyen una secuencia de codificación y secuencias de control apropiadas para proporcionar la expresión apropiada de la secuencia de codificación en el cloroplasto. Casets de expresión típicos incluyen los siguientes componentes: la región 5’ sin traducir de un gen de microorganismo o gen de cloroplasto tal como psbA que

proporcionará la transcripción y traducción de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés en el cloroplasto; una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés; y una región de terminación de traducción y transcripción, tal como una región de repetición 3' invertida de un gen de cloroplasto que puede estabilizar ARN de genes introducidos, mejorando mediante esto la expresión del gen extraño. El caset puede incluir opcionalmente un gen de resistencia a antibiótico.

Comúnmente, el caset de expresión es flanqueado por sitios de restricción convenientes para inserción a un genoma apropiado. El caset de expresión puede ser flanqueado por secuencias de ADN del ADN de cloroplasto para facilitar la integración estable del caset de expresión al genoma de cloroplasto, particularmente mediante recombinación homóloga. Alternativamente, el caset de expresión puede permanecer sin integrar, en cuyo caso, el caset de expresión incluye comúnmente un origen de replicación de cloroplasto, que es capaz de proveer la replicación del ADN heterólogo en el cloroplasto.

El caset de expresión incluye en general una región de promotor de un gen capaz de expresión en el cloroplasto. La región de promotor puede incluir promotores obtenibles de genes de cloroplasto, tal como el gen de psbA de espinaca o garbanzo o la región de promotor de rbcL y atpB de maíz y promotores de

Rrna. Ejemplos de promotores son descritos en Hanley-Bowdoin y Chua, TIBS (1987) 12:67 70; Mullet et al., Plant Molec Biol. (1985) 4: 39 54; Hanley-Bowdoin (1986) PhD. Dissertation, the Rockefeller University; Krebbers et al., Nucleic Acids Res. (1982) 10: 4985 5002; Zurawaki et al., Nucleic Acids Res. (1981) 9:3251 3270; y Zurawski et al., Proc. Nat'l Acad Sci. U.S.A. (1982) 79: 7699 7703. Otros promotores pueden ser identificados y la fuerza relativa de promotores así identificados evaluada, al colocar un promotor de interés 5' a un gen marcador sin promotor y observar su efectividad en relación con la transcripción obtenida de por ejemplo el promotor del gen psbA, un promotor de cloroplasto relativamente fuerte. La eficiencia de la expresión del gen heterólogo puede ser mejorada adicionalmente mediante cualquiera de una variedad de técnicas. Estas incluyen el uso de múltiples promotores insertados en tándem 5’ al gen heterólogo, por ejemplo un promotor psbA doble, la adición de secuencias de mejorador y los semejantes.

Numerosos promotores activos en el cloroplasto de *Chlorella* pueden ser usados para expresión de genes exógenos en el cloroplasto de *Chlorella*, tales como aquellos encontrados en el número de acceso de Genbank NC_001865 (cloroplasto de *Chlorella vulgaris*, genoma completo).

En donde se desea proveer la expresión inducible del gen heterólogo, un promotor inducible y/o una región 5’ sin

traducir que contiene secuencias que proporcionan la regulación a nivel de transcripción y/o traducción (en el extremo 3') puede ser incluidas en el caset de expresión. Por ejemplo, la región sin traducir 5' puede ser de un gen en donde la expresión es regulable por la luz. Similarmente, las regiones de repetición 3' invertidas podrían ser usadas para estabilizar ARN de genes heterólogos. Los genes inducibles pueden ser identificados mediante expresión mejorada en respuesta a un estímulo de interés particular y baja expresión o expresión ausente en ausencia del estímulo. Por ejemplo, un gen inducible por luz puede ser identificado, en donde la expresión mejorada ocurre durante la irradiación con luz, en tanto que una expresión sustancialmente reducida o ninguna expresión ocurre con baja luz o ninguna luz. Promotores regulador por luz de microalgas verdes son conocidos (véase por ejemplo Mol Genet Genomics. 2005 Dic; 274(6):625-36).

La región de terminación que es empleada será principalmente una de conveniencia, puesto que la región de terminación parece ser relativamente intercambiable entre proplastos y bacterias. La región de terminación puede ser natural a la región de inicio de transcripción, puede ser natural a la secuencia de ADN de interés o puede ser obtenible de otra fuente. Véase, por ejemplo, Chen and Orozco, Nucleic Acids Res. (1988) 16:8411.

Los cassettes de expression pueden ser transformados

a una célula de planta de interés mediante cualquiera de una diversidad de métodos. Estos métodos incluyen, por ejemplo métodos biolísticos (véase, por ejemplo Sanford, Trends In Biotech. (1988) 6:299 302, Patente Estadounidense 4,945,050; electroporación (Fromm et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1985) 82:5824 5828); el uso de un as de láser, microinyección o cualquier otro método capaz de introducir ADN a un cloroplasto.

Descripciones adicionales de vectores de expresión de cloroplasto apropiados para uso en microorganismos tales como microalgas se encuentran en la Patente Estadounidense 7,081,567 (expedida el 25 de Julio de 2006 a Xue et al.); 6,680,426 (expedida el 20 de Enero de 2004 a Daniell et al.); y 5,693,507 (expedida el 2 de diciembre de 1997 a Daniell et al.).

Proteínas expresadas en el genoma nuclear de Chlorella pueden ser apuntadas al cloroplasto utilizando señales de apuntamiento de cloroplasto. Secuencias de apuntamiento de cloroplasto endógenas a Chlorella son conocidas, tales como genes en el genoma nuclear de Chlorella que codifican proteínas que son apuntadas al cloroplasto; véase, por ejemplo números de acceso GenBank AY646197 y AF499684. Las proteínas pueden también ser expresadas en el cloroplasto de Chlorella mediante inserción de genes directamente al genoma de cloroplasto. La transformación de cloroplasto ocurre comúnmente por medio de recombinación

homóloga y puede ser efectuada si las secuencias de genoma de cloroplasto son conocidas para creación de vectores de apuntamiento (véase, por ejemplo la secuencia de genoma completa de un cloroplasto de Chlorella; número de acceso Genbank NC_001865). Véase seccones previas en la presente para detalles de transformación de cloroplasto.

2. Expresión en mitocondrias

En otra modalidad de la presente invención, la expresión de un polipéptido en un microorganismo es apuntada a mitocondrias. Métodos para apuntamiento de productos de gen extraño a mitocondrias Boutry et al. Nature (London) (1987) 328:340 342) han sido descritos, en los que se incluyen en microalgas verdes (véase, por ejemplo MoI Gen Genet. 1993 Jan;236(2-3):235-44).

Por ejemplo, un vector de expresión que codifica una señal de secreción apropiada puede apuntar una proteína heteróloga a la mitocondria. El vector IMP ACTVECTOR 1.5 vector, de Wageningen UR- Plant Research International, utiliza la señal de secreción de CoxIV de levadura, que demostró administrar proteínas en la matriz mitocondrial. La proteína es fusionada a los primeros cuatro aminoácidos de la proteína CoxIV de levadura con el fin de permitir el procesamiento apropiado del péptido de señal (Kohler et al. Plant J I l : 613-621 (1997)). Otras secuencias de apuntamiento

mitocondriales son conocidas, en las que se incluyen aquéllas funcionales en microalgas verdes. Por ejemplo, véase FEBS Lett. 1990 Jan 29;260(2): 165-8; y J Biol Chem. 2002 Feb 22;277(8):6051-8.

Las proteínas expresadas en el genoma nuclear de Chlorella pueden ser apuntadas a la mitocondria utilizando señales de apuntamiento mitocondriales. Véase secciones previas en la presente para detalles de apuntamiento de proteína mitocondrial y transformación.

3. Expresión en Retículo Endoplásmico

En otra modalidad de la presente invención, la expresión de un polipéptido en un microorganismo es apuntada al retículo endoplásmico. La inclusión de una señal de retención o clasificación apropiada en un vector de expresión asegura que las proteínas sean requeridas en el retículo endoplásmico (ER) y no avancen corriente abajo al aparato Golgi. Por ejemplo, el vector IMPACTVECTOR1.3, de Wageningen UR- Plant Research International, incluye la señal de retención o clasificación KDEL bien conocida. Con este vector, la retención de ER tiene una ventaja práctica en que se ha reportado que mejora los niveles de expresión 5 veces o más. La razón principal por esto parece ser que el ER contiene concentraciones más bajas y/o diferentes proteasas responsables por la degradación post-producción de proteínas expresadas que están presentes en el

citoplasma. Señales de retención de ER funcionales en microalgas verdes son conocidas. Por ejemplo, véase Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):6225-30.

G. Transformación

Las células pueden ser transformadas mediante cualquier técnica apropiada en las que se incluyen por ejemplo, biolísticas, electroporación, transformación en lecho de vidrio y transformación en bigote de carburo de silicio. Véase, por ejemplo, Ejemplos en la presente.

Cualquier técnica conveniente para introducir un transgen a Chlorella puede ser usada en la presente invención. Dawson et al. (1997) (supra) describió el uso de bombardeo de micro-proyectiles para introducir el gen de nitrato reductasa (NR) de Chlorella vulgaris a mutantes de Chlorella sorokiniana NR-deficientes, dando como resultado transformantes estables. Brevemente, perlas de tungsteno de 0.4 micras fueron recubiertas con plásmido; 3 X 10^7 células de c.sorokiniana fueron esparcidas en el tercio central de una placa de agar no selectiva y bombardeadas con el sistema de distribución de partículas biolísticas PDS- 1000/He Biolistic Particle Delivery© (Bio-Rad).

Un método preferido para introducir un gen a Chlorella es el método descrito por Kim et al. (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73. Kim reporta la transformación de

protoplastos de Chorella ellipsoidea utilizando $CaCl_2$ y polietilenglicol (PEG). En particular, los protoplastos fueron preparados al cultivar células de C.ellipsoidea a una densidad de 1-2 X 10^8/M1. Las células fueron recuperadas y lavadas mediante centrifugación por 5 minutos a 1600 g y resuspendidas en 5 M1 de solución reguladora de Ph de fosfato (Ph 6.0) que contiene sorbitol 0.6 Ml, manitol 0.6 M, celulosa al 4% (peso/volumen) (Calbiochem), macerasa al 2% (peso/volumen) (Calbiochem) y 50 unidades de pectinasa (Sigma). La suspensión celular fue incubada a 25°C por 16 horas en la oscuridad con sacudimiento moderado. Los protoplastos resultantes fueron recuperados mediante centrifugación a 400 g por 5 minutos. La pelotilla fue resuspendida suavemente en 5 Ml de medio f/2 que contiene sorbitol 0.6 M y manitol 0.6 M y centrifugada en 400 g durante 5 minutos. Esta pelotilla fue resuspendida en 1 Ml de solución de sorbitol/manitol 0.6 M que contiene mMCaC_{12}. 50 mL. Luego, se agregaron 5 mg de ADN de transgen, junto con 25 µg de ADN de timo de becerro (Sigma), a 10^7-10^8 protoplastos en 0.4 Ml. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 200 µL de PNC (polietilenglicol 4000, al 40%, NaCl 0.8 M, $CaCl_2$ 50 Mm) y mezclados moderadamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, 0.6 ml de medio f/2 complementado con solución de sorbitol/manitol 0.6 M, extracto de levadura al 1% y glucosa al 1% fueron agregados y las células transformadas fueron incubadas a 25°C por 12 horas

en la oscuridad para la regeneración de pared celular. Un método similar fue usado por Huang et al. (2007) (supra) para introducir un transgen que codifica reductasa mercúrica a Chlorella sp. DT.

La electroporación también se ha empleado para transformar Chorella. Como se reporta por Maruyama et al. (2004), Biotechnology Techniques 8:821-826 (incorporada por referencia en la presente en su totalidad), esta técnica fue usada para introducir un transgen a protoplastos de Chlorella saccharophila c-211-1 preparados de las células en la fase estacionaria. La expresión transitoria del plásmido introducido fue observada bajo una intensidad de campo de entre 600 y 900 V/cm, y una duración de impulso de alrededor de 400 ms, en donde se determinó la alta permeabilidad de membrana a 70-kDa FITC-dextrana.

Ejemplos de expresión de transgenes en Chlorella se pueden encontrar en la literature (véase, por ejemplo Current Microbiology Vol. 35 (1997), pp. 356-362; Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2000 Jul;16(4):443-6; Current Microbiology Vol. 38 (1999), pp. 335-341; Appl Microbiol Biotechnol (2006) 72: 197-205; Marine Biotechnology 4, 63-73, 2002; Current Genetics 39:5, 365-370 (2001); Plant Cell Reports 18:9, 778-780, (1999); Biologia Plantarium 42(2): 209-216, (1999); Plant Pathol. J 21(1): 13-20, (2005)). También véanse ejemplos en la presente.

Ejemplos de expresión de transgenes en levadura

oleaginosa (por ejemplo, Yarrowia lipolytica) se pueden encontrar en la literatura (véase, por ejemplo, Bordes et al., J Microbiol Methods, Jun 27 (2007)). Ejemplos de expresión de transgenes en hongos (por ejemplo, Mortierella alpine, Mucor circinelloides, y Aspergillus ochraceus) también se pueden encontrar en la literature (véase, por ejemplo Microbiology, JuI; 153(Pt. 7):2013-25 (2007); MoI Genet Genomics, Jun; 271(5):595-602 (2004); Curr Genet, Mar;21(3):215-23 (1992); Current Microbiology, 30(2):83-86 (1995); Sakuradani, NISR Research Grant, "Studies of Metabolic Engineering of Useful Lipid-producing Microorganisms" (2004); y PCT/JP2004/012021). Ejemplos de expresión de genes exógenos en bacterias tales como E. coli son bien conocidos; véase, por ejemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press.

Vectores para transformación de microorganismos de acuerdo con la presente invención pueden ser preparados mediante técnicas conocidas familiares a aquéllos experimentados en el arte. La secuencia de nucleótidos del constructo usado para transformación de múltiples especies de Chlorella corresponde a SEQ ID NO:25. En una modalidad, un diseño de vector ejemplar para expresión de un gen de lipasa en un microorganismo tal como una microalga contiene un gen que codifica una lipasa en enlace operable con un promotor activo en microalgas. Alternativamente, si el vector no contiene un

promotor en enlace operable con el gen de interés, el gen puede ser transformado a la célula, de tal manera que es enlazado operativamente a un promotor endógeno en el punto de integración del vector. El método de transformación sin promotor ha probado funcionar en microalgas (véase, por ejemplo Plant Journal 14:4, (1998), pp.441-447). El vector puede también contener un segundo gen que codifica una proteína que por ejemplo imparte resistencia a un antibiótico o herbicida, esto es, un marcador seleccionable. Opcionalmente, uno o ambos genes son seguidos por una secuencia sin traducir 3' que contiene una señal de poliadenilación. Cassettes de expresión que codifican los dos genes pueden ser enlazados físicamente en el vector o sobre vectores separados. También se puede usar la co-transformación de microalgas en la cual moléculas de vector distintas son usadas simultáneamente para transformar células (véase, por ejemplo Protist 2004 Dec; 155(4):381-93). Las células transformadas pueden ser opcionalmente seleccionadas en base a la habilidad para crecer en presencia del antibiótico u otro marcador seleccionable bajo condiciones en las cuales las células que carecen del cassette de resistencia no crecerían.

Todas las referencias citadas en la presente, en las que se incluyen Patentes, Solicitudes de Patentes y Publicaciones son incorporadas por referencia en la presente en su totalidad, ya sea previamente incorporadas específicamente o no. Las publicaciones mencionadas en la presente son citadas

por el propósito de describir y revelar reactivos, metodologías y conceptos que pueden ser usados en relación con la presente invención. Nada en la presente será interpretado como admisión de que estas referencias son arte previo en relación con la invención descrita en la presente.

Aunque esta invención ha sido descrita en relación con modalidades específicas de la misma, se comprenderá que es apta de modificaciones adicionales. La presente solicitud se propone cubrir cualesquier variaciones, usos o adaptaciones de la invención que siguen en general los principios de la invención y que incluyen tales desviaciones de la presente revelación como entren en la práctica conocida o acostumbrada en el arte con la cual la invención es concerniente y como puedan ser aplicadas a los elementos esenciales resumidos anteriormente en la presente.

X. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar pero no limitar la invención reivindicada.

EJEMPLO 1

Cepas de Chlorella de la colección de cultivo dela Universidad de Texas fueron probadas en cuanto a crecimiento sobre glicerol y glucosa. Las siguientes especies y cepas de Chlorella fueron cultivadas: Chlorella kessleri (cepas 263,

397, 398, 2228); Chlorella sorokiniana (cepas 1663, 1665, 1669, 1671, 1810); Chlorella saccharophila (2911; 2469); Chlorella protothecoides (31, 249, 250, 264). Cada cepa fue inoculada del medio sólido a un medio a base de líquido de 25 ml (2g/L de extracto de levadura, $NaNO_3$ 2.94mM, $CaCl_2$'$2H_2O$ 0.17mM, $MgSO_4$«$7H_2O$ 0.3mM, $K_2HPO_4$0.4mM, KH_2PO_4 1.28mM, NaCl 0.43mM) y cultivadas con agitación a 27°C durante 72 horas bajo una intensidad de luz de 75 75µEm~V[1]. Estos cultivos fueron usados para inocular cada cepa a una densidad final de $1x10^5$ células/ml en placas de 24 cavidades que contienen 2 ml de (a) medios de base solamente (b) medios de base más glucosa al 0.1% y (c) medios de base mas glicerol grado reactivo al 0.5% (EM Science, catalog #GX0185-6). Las placas fueron colocadas en la oscuridad y cultivadas durante 72 horas con agitación a 27°C. Las muestras de cada cepa cultivada en las tres condiciones fueron diluídas 1.9:1 en Samples of each strain grown in the three conditions were diluted 1.9:1 en H_2O destilada y la absorbancia fue leída a 600 nm en un Molecular Devices SpectraMax 340PC. Todas las cepas exhibieron crecimiento en presencia de glucosa y glicerol en comparación a solamente medios de base.

EJEMPLO 2

Cepas y medios: Chlorella protothecoides #1 (CEPA 250), #2 (CEPA 264) y Chlorella kessleri #1 (CEPA 398) fueron

obtenidos de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, USA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de Proteosa modificado. El medio de Proteosa modificado consistía (en g/L) de 0.25 g de $NaNO_3$, 0.09 g de K_2HPO_4, 0.175 g de KH_2PO_4, 0.025 g de $CaCl_2$-$2H_2O$, 0.075 g de $MgSO_4$-$7H_2O$ y 2 g de extracto de levadura por litro. Se obtuvieron desperdicios de glicerol de la producción de biodiesel (glicerol acidulado (AG)) y glicerol sin acidular (NAG) de Imperial Western Products (Selma, CA, USA). El glicerol "puro" o "grado reactivo" fue de EM Science (una división de Merck KGA), número de catálogo #GX0185-6.

Diseño experimental y medición de crecimiento: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteasa + glicerol puro al 1%

2. Proteasa + glicerol acidulado al 1%

3. Proteasea + glicerol sin acidular al 1%

4. Proteasa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas).

5. Proteasa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

6. Proteasa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas).

Cada cepa fue inoculada a diferentes medios a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron

mantenidos en la oscuridad y fueron agitados por el sacudidor orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 72 horas de cultivo inicial, se agregó glucosa al 1% (peso/volumen) a las muestras de #4, 5, y 6 y cultivadas otras 24 horas. Para medir el peso seco de célula, 1 ml de cada cultivo fue aglomerado mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5415C. Después de remover el sobrenadante, las pelotillas celulares fueron congeladas a -80°C y liofilizadas en un secador por congelación a escala de laboratorio (Labconco, MO, Estados Unidos de América). Los resultados son mostrados en la Figura 1.

EJEMPLO 3

Cepas y medios: Chlorella protothecoides #1 (CEPA 250), #3 (CEPA 249) y Chlorella kessleri #2 (cepa 397) fueron obtenidas de la Colección de Cultivo de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2).

Diseño experimental y medición de crecimiento: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1%

2. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%

3. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%.

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados por el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas, el crecimiento celular fue medido mediante el peso seco de célula (véase EJEMPLO 2). Los resultados son mostrados en la Figura 2.

EJEMPLO 4

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #3 (CEPA 249), #4 (CEPA 31) y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron obtenidos de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos en un medio de Proteosa modificado (véase EJEMPLO 2)

Diseño experimental y análisis de lípido: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1%

2. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%

3. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen diferentes gliceroles (puro, acidulado o sin acidular) a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitador por el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas, se midió el contenido de lípido. Para medir la cantidad de contenido de lípido en las células, 100 µl de cultivos fueron recolectados y lavados una vez con el mismo volumen de medios. A cada tubo, se agregaron 5 µl de células lavadas y 200 µl de ácido sulfúrico 18 M. Los tubos fueron incubados a 90°C en un baño de agua durante 30 minutos y se agregó 1 ml de ácido reactivo de fosfórico-vanillina a los tubos e incubados a 37°C por 15 minutos. Para preparar el reactivo de ácido fosfórico-vanillina reactivo, se agregaron 0.12 g de vanillina a 20 ml de agua y el volumen fue ajustado a 100 ml con ácido fosfórico al 85%. La densidad óptica a 530 nm fue medida en una cubeta de vidrio contra un tubo de referencia con 5 µl de agua como muestra. Los resultados son mostrados en la Figura 3.

EJEMPLO 5

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #2 (CEPA 264) y *Chlorella kessleri* #1 (CEPA 398) fueron obtenidos de la Colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2).

Diseño experimental y análisis del lípido: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1%

2. Proteosa + glicerol sin acidular al 1%

3. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

4. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregado después de 72 horas).

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen diferentes gliceroles (puro o sin acidular) a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% a la muestra #3 y #4 y cultivada otras 24 horas. El contenido de lípido fue medido en todas las muestras (véase EJEMPLO 4). La densidad óptica a 600 nm fue también medida para verificar en cuanto a absorbancia no específica y restada de O. D. 530 nm para calcular la cantidad de lípido. La curva de referencia está compuesta de trioleína disuelta en cloroformo que fluctúa de 1 a 10 µg. Los resultados son mostrados en la Figura 4.

EJEMPLO 6

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #3 (CEPA

249) y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron obtenidas de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: Para cada cepa, se preparo 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregado después de 72 horas)

2. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

3. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen diferentes gliceroles (puro, acidulado o sin acidular) a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% y fue cultivado otras 24 horas. El peso seco de célula y contenido de lípido fueron medidos en todas las muestras (véase EJEMPLOS 2 y 5). El porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de lípido total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la Figura 5.

EJEMPLO 7

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #2 (CEPA 264) y *Chlorella kessleri* #1 (CEPA 398) fueron obtenidos de la Colección de Cultivo de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

2. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada con medios que contienen ya sea glicerol puro al 1% o glicerol sin acidular al 1% a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% y fue cultivado otras 24 horas. El peso seco de célula y contenido de lípido fueron medidos en todas las muestras (véanse EJEMPLOS 1 y 4). El porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de lípido total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la Figura 6.

EJEMPLO 8

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #1 (CEPA 250), #4 (CEPA 31) y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron obtenidas de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 2)

Diseño experimental y análisis de lípido: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en las placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glucosa al 2%

2. Proteosa + glicerol al 1% + glucosa al 1%

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados por un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas de crecimiento inicial, el contenido de lípido fueron medido (véase EJEMPLO 5). Los resultados son mostrados en la Figura 7.

EJEMPLO 9

Cepas y medios: *Chlorella protothecoides* #3 (cepa 249), #4 (cepa 31) y *Chlorella kessleri* #1 (cepa 398) fueron obtenidos de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un

medio de proteosa modificado (vease ejemplo 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: para cada cepa, se preparó 1ml de los siguientes medios en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glucosa al 2%
2. Proteosa + glicerol 1% + glucosa al 1%
3. Proteosa + glicerol 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 72 hrs de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% (peso/volumen) al medio número 3 y cultivados otros 24 hrs. Se midieron el peso seco de células y el contenido de lípidos en todas las muestras (véanse ejemplos 2 y 5). El porcentaje de lípidos fue calculado a partir de la cantidad total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la figura 8.

EJEMPLO 10

Cepas y medios: *Chlorella protothecoides* #1 (cepa 250), #3 (cepa 249) y *Chlorella kessleri* #2 (cepa 397) fueron obtenidos de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un

medio de proteosa modificado (vease ejemplo 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: para cada cepa, se preparó 1ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1%
2. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)
3. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
4. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)
5. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
6. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 72 hrs de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% (peso/volumen) al medio número 2, número 4 y número 6 y cultivados otras 24 hrs. El contenido de lípido fue medido en todas las muestras (véanse ejemplos 4). Los resultados son mostrados en la figura 9.

EJEMPLO 11

Cepas y medios: *Chlorella protothecoides* #1 (cepa

250), #3 (cepa 249), #4 (cepa 31) y *Chlorella kessleri* #2 (cepa 397) fueron obtenidos de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (vease ejemplo 2).

Diseño experimental y análisis de lípido: para cada cepa, se preparó 1ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1%
2. Proteosa + glicerol puro al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)
3. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
4. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)
5. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
6. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (agregada después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 72 hrs de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% (peso/volumen) a los medios número 2, número 4 y número 6 y cultivados otras 24 hrs. El peso seco de célula fue medido en todas las muestras (véanse ejemplo 2). Los resultados son mostrados en la figura

10.

EJEMPLO 12

Construcción del vector

Un fragmento de BaMHI-SacII que contiene el promotor CMV, un cADN resistente a higromicina y CMV 3' UTR (SEQ ID NO:5, una subsecuencia del vector pCAMBIA1380, Cambia, Canberra, Australia) fue clonada a los sitios BamHI y SacII de pBluescript y es denominado en la presente como pHyg.

Transformación biolística de Chlorella

Portadores de oro de S550d de Seashell Technology fueron preparados de acuerdo con el protocolo dl fabricante. El plásmido pHyg linealizado (20 μg) fue mezclado con 50 μl de solución reguladora de pH enlace y 60 μl (30mg) de portadores dorados S550d e incubados en hielo durante 1min. Se agregó la solución reguladora del pH de precipitación (100 μl) y la mezcla fue incubada en hielo por otro minuto. Después de haber sido sometidas al vortex, las partículas recubiertas con ADN fueron aglomeradas mediante centrifugación a 10,000rpm en una microfuge Eppendorf5415C durante 10seg. La pelotilla dorada fue lavada una vez con 500 μl de etanol al 100% frío, aglomerada mediante breve centrifugación en la microfuge y re-suspendida con 50 μl de etanol helado. Después de una breve sonificación (1 – 2seg), 10 μl de partículas recubiertas con ADN fueron

transferidas inmediatamente a la membrana del portador.

El cultivo de *Chlorella protothecoides* (Universidad de Texas, colección de cultivos 250) fue cultivado en un medio de Proteosa (2gr/lt de extracto de levadura, $NaNO_3$ 2.94mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.17mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3mM, K_2HPO_4 0.4mM, KH_2PO_4 1.28mM, NaCl 0.43mM) sobre un agitador giratorio bajo una luz continua a 75 μmol fotones m^{-2} s^{-1} hasta que llegó a una densidad celular de $2X10^6$ células/ml. Las células fueron cosechadas, lavadas una vez con agua destilada estéril y resuspendidas en 50 μl de medio. $1X10^7$ células fueron esparcidas en el tercio central de una placa de medios de Proteosa no selectiva. Las células fueron bombardeadas con el sistema de administración de partículas biolístico PDS-1000/He (Bio-Rad). Se utilizaron discos de ruptura (1100 y 1350 psi) y las placas fueron colocadas a 9 y 12 cm debajo del conjunto tamiz/macroportador. Se permite que las células se recuperen a 25°C durante 12 – 24 hrs. Después de la recuperación, las células fueron raspadas de las placas con una espátula de hule o caucho, mezcladas con 100 μl del medio y esparcidas sobre placas que contienen higromicina (200 μg/ml). Después de 7 – 10 días de incubación a 25°C, colonias que representan células transformadas fueron visibles sobre las placas de los discos de ruptura de 1100 y 1350 libras fuerza/pulgada^2 y de distancia de 9 y 12 cm. Las colonias fueron recolectadas y sembradas sobre placas de agar selectivas para una segunda ronda de selección.

Transformación de *Chlorella* mediante Electroporación

El cultivo de *Chlorella protothecoides* fue cultivado en un medio de Proteosa sobre u agitador giratorio bajo luz continua a sobre un agitador giratorio bajo una luz continua a 75 μmol fotones m^{-2} s^{-1} hasta que llegaron a una densidad celular de $2X10^6$ células/ml. Las células fueron cosechadas, lavadas una vez con agua destilada estéril y resuspendidas en una solución reguladora del pH de Tris-fosfato (Tris-HCl 20mM, pH 7.0; fosfato de potasio 1mM) que contiene sacarosa 50mM a una densidad de $1X10^8$ células/ml. Una suspensión de aproximadamente 250 μl de células ($1X10^8$ células) fue colocada en una cubeta de electroporación desechable de un espacio de 4mm. A la suspensión celular, 5 μg de ADN del plásmido pHgy linealizado y 200 μg de ADN portador (ADN de esperma de salmón sometido a esfuerzo constante) fueron agregados. Luego, la cubeta de electroporación fue incubada en un baño de agua a 16°C por 10min. Luego se aplicó un impulso eléctrico (1100 V/cm) a la cubeta a un capacitancia de 25 μF (no se utilizó ningún receptor de derivación para la electroporación) utilizando un aparato de electroporación Gene Pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA). Luego la cubeta fue incubada a temperatura ambiente durante 5min, seguido de lo cual la suspensión celular fue transferida a 50 ml de medio de Proteosa y agitada sobre un agitador giratorio por 2 días. En seguida de

la recuperación, las células fueron cosechadas mediante centrifugación a baja velocidad, resuspendidas en medios de Proteosa y depositada a baja densidad sobre placas complementadas con 200 μg/ml de higromicina. Las placas fueron incubadas bajo luz continua a 75 μmol fotones m^{-2} s^{-1}. Los transformantes, aparecieron como colonias en 1 – 2 semanas. Las colonias fueron recolectadas y sembradas sobre placas de agar selectivas para una segunda ronda de selección.

Genotipo

Un subconjunto de colonias que sobrevivieron a una segunda ronda de selección fueron cultivadas en un volumen pequeño y cosechadas. Pelotillas de aproximadamente 5 – 10 μl de volumen fueron resuspendidas en 50μl de NaEDTA 10mM mediante vórtice y luego incubadas a 100°C por 10. Los tubos fueron luego sometidos a vórtice brevemente y sonificados por 10seg, luego centrifugados a 12,000 xg por 1min. Se usaron 2 μl de sobrenadante como plantilla en una reacción de PCR de 50μl. los cebadores usados para el genotipo fueron SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7. Las condiciones de PCR fueron como sigue: 95°C 5min x 1 ciclo; 95°C 30 seg – 58°C 30 seg – 72°C, 1min, 30 seg x 35 ciclos; 72°C 10min x 1 ciclo. El fragmento de 992 pb esperado fue encontrado en 6 de 10 colonias del método biolístico y de una sola colonia de electroporación. Una banda de tamaño menor, no específica estuvo presente en todos los carriles. Los

resultados son mostrados en la figura 16. Para confirmar la identidad de los fragmentos de 992pb amplificado, dos bandas biolísticas y la banda de electroporación fueron extirpadas del gel y secuenciadas individualmente. La secuencia de todas las tres bandas correspondía al fragmento de 992pb esperado. (DNA ladder:Bionexus® All Purpose Hi-Lo® DNA ladder catalog#BN2050).

EJEMPLO 13

Cepas y medios: a) *Spirulina platensis* (UTEX 2340)y b) *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) fueron obtenidos de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). El cultivo concentrado de *Spirulina* fue mantenido en medio de Spirulina y *Navicula* fue mantenida en un medio de extracto de suelo (SEM). El medio de Spirulina consistía de $NaHCO_3$ 162mM, Na_2CO_3 38mM, K_2HPO_4 1.9mM, $NaNO_3$ 29mM, K_2SO_4 5.75mM, NaCl 17.1mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.25mM, Na_2EDTA 2mM, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.36mM, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.21mM, $ZnCl_2$ 0.037mM, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0085mM, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.017, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.78μM, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15μM, H_3BO_3 10μM y vitamina B_{12} 0.001mM. El medio de extracto de suelo consiste de $NaNO_3$ 2.94Mm, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.17mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3mM, K_2HPO_4 0.43mM, KH_2PO_4 1.29mM, NaCl 0.43mM y extracto de suelo. Los desperdicios de glicerol de la producción de biodiesel (glicerol acidulado (AG) y glicerol sin acidular (NAG) fueron obtenidos de Imperial Western Products (Selma, CA, USA).

Diseño experimental y medición de crecimiento: para cada cepa, se preparó 1ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

a)

7. Medio de Spirulina + glucosa al 2%
8. Medio de Spirulina + glicerol grado reactivo al 2%
9. Medio de Spirulina + glicerol sin acidular al 2%
10. Medio de Spirulina + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%

b)

1. SEM + glucosa al 2%
2. SEM + glicerol grado reactivo al 2%
3. SEM + glicerol grado reactivo al 1% + glucosa al 1%
4. SEM + glicerol acidulado al 2%
5. SEM + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
6. SEM + glicerol sin acidular al 2%
7. SEM + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 96 hrs se midió el contenido de lípido. Para medir la cantidad de contenido de lípido en las células, se recolectaron 100µl de cultivos de lavados una vez con el mismo volumen de medios. A cada tubo, se agregaron 5µl de células lavadas y 200µl de ácido

sulfúrico 18M. los tubos fueron incubados a 90°C en un baño de agua por 10min y se agregaron 1ml de reactivo de ácido fosfórico-vanillina a los tubos e incubados a 37°C por 15min. Para preparar el reactivo de ácido fosfórico- vanillina se agregaron 0.12 g de vanillina a 20ml de agua y el volumen fue ajustado a 100ml con acido fosfórico al 85%. La densidad óptica a 530nm fue leída en una cubeta de vidrio contra un tubo e referencia con 5μl de agua como muestra. La curva de referencia está compuesta de Trioleina disuelta en cloroformo que fluctúa de 1 a 10μg.

Para medir el peso seco de célula, 0.5ml de cada cultivo fueron aglomerados mediante centrifugación a 5000rpm por 5min. Después de remover el sobrenadante, las pelotillas celulares fueron congeladas a -80°C y secadas durante toda la noche en un sistema de secado por congelación (Labconco, MO, Estados Unidos de América). El porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de lípido total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la figura 11.

EJEMPLO 14

Cepas y medios: a) *Scenedesmus armandus* (UTEX 2552) fue obtenido de la colección de cultivos de algas en la Universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre

medio de Proteosa modificado. El medio de Proteosa modificado consistía (g/L) de 0.25g de $NaNO_3$, 0.09g de K_2HPO_4, KH_2PO_4, 0.025g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.075g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 2g de extracto de levadura por litro.

Diseño experimental y medición de crecimiento y de lípido: para cada condición de cultivo, se preparó 1ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

a), b)

1. Proteosa + glucosa al 2%
2. Proteosa + glicerol 2%
3. Proteosa + glicerol acidulado al 2%
4. Proteosa + glicerol sin acidular al 2%
5. Proteosa + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%

Scenedesmus armandus (UTEX 2552) fue inoculado a medios diferentes a una concentración de $5X10^5$ células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la obscuridad y agitados por el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430rpm. Después de 96 hrs se crecimiento celular fue medido por el peso seco de célula y el contenido de lípido fue medido mediante el análisis de fosforo-vanillina (vease ejemplo 13). El porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad total de lípido dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la figura 12.

EJEMPLO 15

Cepas y Medios: *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) fue obtenido de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de extracto de suelo (véase EJEMPLO 13).

Diseño experimental y medición de crecimiento: Para cada condición de cultivo, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. SEM + glucosa al 2%
2. SEM + glicerol al 2%
3. SEM + glicerol acidulado al 2%
4. SEM + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
5. SEM + glicerol sin acidular al 2%
6. SEM + glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%.

Navicula pelliculosa (UTEX 667) fue inoculado a medios que contienen glucosa o diferentes gliceroles (puro, acidulado o sin acidular) a una concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados por un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas, el crecimiento celular fue medido mediante el peso seco de célula (véase EJEMPLO 13). Los resultados son mostrados en la Figura 13.

EJEMPLO 16

Cepas y Medios: *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) y

Navicula pelliculosa (UTEX 667) fueron obtenidos de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado para *Scenedesmus armatus* y medio de extracto de suelo para *Navicula pelliculosa* (véase EJEMPLO 1).

Diseño experimental y medición de crecimiento: Para cada cepa, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

Scenedesmus armatus

5. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%

6. Proteosa + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregado después de 72 horas)

Navicula pelliculosa

1. SEM + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%

2. SEM + glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (agregado después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento inicial, se agregó glucosa al 1% a la muestra #2 y fue cultivada otras 24 horas. El crecimiento celular fue medido mediante peso seco de célula (véase EJEMPLO 13). Los resultados

son mostrados en la Figura 14.

EJEMPLO 17

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) fue obtenido de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 1).

Diseño experimental: Para cada condición, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

4. Proteosa
5. Proteosa + glucosa al 0.5%
6. Proteosa + xilosa al 0.5%
7. Proteosa + glucosa al 0.25% + xilosa al 0.25%.

Chlorella protothecoides #4 (UTEX 31) fue inoculado a medios que contienen diferentes azúcares (glucosa o xilosa) a una concentración de 3 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados por un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento, el crecimiento celular fue medido al contar los números de células de cada cultivo. Los resultados son mostrados en la Figura 15.

EJEMPLO 18

Las cepas #1, #3 y #4 de *Chlorella protothecoides* fueron obtenidas de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, EUA). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre un medio de proteosa modificado (véase EJEMPLO 1). Para cada condición, se preparó 1 ml de los siguientes medios diferentes en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa
2. Proteosa + glucosa al 1%
3. Proteosa + fructosa al 1%

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen azúcares diferentes (glucosa o fructosa) a una concentración de 1 x 10^6 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 96 horas de crecimiento, la densidad celular fue medida al contar los números de células de cada cultivo. Los resultados son mostrados en la Figura 20.

EJEMPLO 19

Chlorella sobre Sacarosa

Materiales y métodos: *Chlorella protothecoides* (UTEX 249) fue inoculada a tres matraces de 50 ml de medio de proteosa con sacarosa al 1% (2.94 mM $NaNO_3$, 0.428 mM K_2HPO_4, 1.28 mM KH_2PO_4, 0.427 mM NaCl, 0.17 mM $CaCl_2$-$2H_2O$, 0.3 mM $MgSO_4$-$7H_2O$, Proteosa peptona 1 g/L) a una densidad celular final de 4

x 10^5 células por ml. Se agregó invertasa (Sigma #14504) a dos de los cultivos a 0.01 U/ml y 0.05 U/ml. Todos los tres cultivos fueron cultivados en la oscuridad por ~60 hrs agitando a 150rpm.

Resultados: Se efectuaron conteos de células finales en todos los tres cultivos después de ~60 hrs de agitación en la oscuridad. El matraz de control o testigo llegó a $4.4x10^5$ células por ml en tanto que los matraces de 0.01 U/ml y 0.05 U/ml llegaron a densidades celulares de $1x10^8$ y $3x10^8$ respectivamente. Cada matraz fue verificado en cuanto a contaminación al final del experimento mediante análisis microscópico y todos estuvieron limpios.

EJEMPLO 20

Cepas de Chlorella que crecen sobre sacarosa

Cultivos de Chlorella kessleri ((a) UTEX 397 y (b) UTEX 398) y Chlorella fusca ((a) UTEX 251 y(b) UTEX 1801) fueron inoculados de cultivos líquidos autotrópicos a 10 ml de medio de proteosa + sacarosa al 1% en matraces de 50 ml a una concentración de 1 x 10^6 células/ml. También se inocularon cultivos de control a la misma densidad con solamente medios de proteosa. Los cultivos fueron cultivados a 200°C en la oscuridad sacudiendo a 250 rpm por 7 días, punto en el cual la densidad celular fue medida mediante hemocitómetro. Como se muestra en las Figuras 21-22, todas las cuatro cepas crecieron

sobre sacarosa en comparación con la densidad celular inicial y el control de solamente proteosa.

EJEMPLO 21

Crecimiento de Chlorella protothecoides sobre melasas con una invertassa de sacarosa.

Preparación de células de Chlorella para inoculación: Se inició un cultivo de líquido de 10 ml de Chlorella tomando el inóculo de una placa de proteosa sólida. Los cultivos fueron cultivados en la luz por aproximadamente 2 días a 26°C. El crecimiento fue medido utilizando un densitómetro óptico (OD) a 750 nm y al determinar los pesos secos de células.

Preparación de melasa y soluciones concentradas de azúcar: Una solución concentrada al 5% fue preparada con glucosa, sacarosa y 3 muestras de melasas diferentes (marcadas como BSl, BS2 y HTM) obtenidas del proceso comercial de caña de azúcar a azúcar, como se muestra en la siguiente Tabla 13. El pH de todas las soluciones concentradas fue verificado para estar en el intervalo de 6-6.6 y luego las soluciones concentradas fueron sometidas a autoclave.

Tabla 13. Melasas y soluciones de azúcar

Melasas	% de azúcar	azúcar al 5% diluido en 100 ml
		gramos o ml
HTM	78.72	6.4
BS1 (FL)	44.25	11.3
BS2 (AU)	51.55	9.7
Sacarosa	100	5
Glucosa	100	5

Preparación de Solución de Invertasa: Una solución concentrada de 40 unidades/ml de invertasa fue preparada al reconstituir 1 mg de una invertasa de 400 unidades/mg (Sigma) en 10 ml de agua destilada.

Condiciones experimentales y montajes: Se prepararon cultivos de 10 ml, cada uno que consiste de una concentración final de melasas/azúcar de 1%, 0.05 unidades/ml de invertasa y $1.0x10^6$ células por ml de Chlorella protothecoides en un medio de proteasa base. Los cultivos fueron numerados como sigue: (1) medios de control solamente; (2) 1% HTM; (3) 1% BSl ; (4) 1% BS2; (5) glucosa al 1%; y (6) sacarosa al 1%. También se preparó un conjunto de control similar sin la adición de invertasa. Los cultivos fueron cultivados en la oscuridad por 5 días agitando a 250 rpm a 28°C.

Resultados: El crecimiento las células de Chlorella protothecoides fue evaluado enseguida de los 5 días de incubación sobre la materia prima de alimentación respectiva en

la oscuridad. Como se muestra en las Figuras 23-24, las células pueden ser cultivadas en melasas en presencia de una invertasa de sacarosa con rendimientos comparables a aquéllos del cultivo sobre glucosa grado reactivo pura.

EJEMPLO 22

Diseño genético de Chlorella protothecoides para expresar una Invertasa de Sacarosa Exógena.

Cepas y Medios: Chlorella protothecoides (UTEX 250) fue obtenido de la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, Estados Unidos de América). Los cultivos concentrados fueron mantenidos sobre medio de proteosa modificado. El medio de proteosa modificado consiste de 0.25 g de $NaNO_3$, 0.09 g de K2HPO_4, 0.175 g de KH2PO_4, 0.025 g de $CaCl_2$-2H_2O, 0.075 g de $MgSO_4$-7H_2O, y 2 g de extracto de levadura por litro (g/L).

Construcción del plásmido: Para expresar la forma secretada de invertasa en Chlorella protothecoides, un gen SUC2 de Saccharomyces cerevisiae fue colocado bajo el control de tres promotores diferentes: promotor 35S de Virus de Mosaico de Coliflor (CMV), promotor de virus de Chlorella (NC-IA) y promotor HUPl de Chlorella. Un gen SUC2 de levadura fue sintetizado para acomodar el uso de codón optimizado por C. protothecoides e incluye una secuencia de señal requerida para dirigir la secreción extracelular de invertasa. Cada

constructo fue integrado en pBluescript KS+, y EcoRI/AscI, Ascl/Xhol, y XhoI/BamHI y sitios fueron introducidos a cada promotor, gen de invertasa y CMV 3'UTR, respectivamente, mediante amplificación de PCR utilizando cebadores específicos. Productos de PCR purificados fueron clonados secuencialmente. Una ilustración de los constructos finales es mostrado en la Figura 25.

Transformación de Chlorella protothecoides: Un cultivo de Chlorella protothecoides fue cultivado en medio de proteasa modificado sobre un agitador giratorio bajo luz continua a 75 µmol fotones m^{-2} S^{-1} hasta que alcanzó una densidad celular de $6x10^6$ células/ml.

Para transformación biolística, portadores dorados de S550d de Seashell Technology fueron preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, un constructo linealizado (20 µg) mediante Bsal fue mezclado con 50 µl de solución reguladora del enlace y 60 µl (3 mg) de portadores dorados S550d e incubados en hielo por 1 minuto. Se agregó solución reguladora de pH de precipitación (100 µl) y la mezcla fue incubada en hielo por otro 1 minuto. Después de vórtice moderada, las partículas recubiertas con AND fueron aglomeradas mediante centrifugación a 10,000 rpm en una microfuga de Eppendorf por 10 segundos. La pelotilla dorada fue lavada una vez con 500 µl de etanol al 100% frío, aglomeradas mediante breve centrifugación en la microfuga y resuspendida con 50 µl

de etanol helado. Después de una breve solidificación (1-2 segundos), 10 µl de partículas recubiertas con ADN fueron transferidas inmediatamente a la membrana portadora. Las células fueron cosechadas, lavadas una vez con agua destilada estéril, resuspendidas en 50 µl del medio (1 x 10^7 células) y fueron esparcidas en el tercio central de una placa proteosa no selectiva. Las células fueron bombardeadas con el sistema de administración de Partículas Biolísticas PDS-1000/He (Bio-Rad). Se usaron discos de ruptura (1100 y 1350 psi) y las placas fueron colocadas 9-12 cm debajo del conjunto de tamiz/macroportador. Se permite que las células se recuperen a 25°C durante 12-24 horas. Después de la recuperación, las células fueron raspadas de las placas con una espátula de hule o caucho, mezcladas con 100 µl de medio y esparcidas sobre placas de proteosa modificada con sacarosa al 1%. Después de 7-10 días de incubación a 25°C en la oscuridad, colonias que representan células transformadas fueron visibles sobre las placas.

Para transformación con electroporación, las células fueron cosechadas, lavadas una vez con agua destilada estéril y resuspendidas en una solución reguladora de pH de Tris- fosfato (Tris-HCl 20 mM pH 7.0; fosfato de potasio 1 mM) que contiene sacarosa 50 mM a una densidad de 4x10^8 células/ml. Aproximadamente 250 µl de suspensión celular (1x10^8 células) fue colocada en una cubeta de electroporación desechable de

espacio de 4 mm. A la suspensión celular, se agregaron 5 µg de AND de plásmido linealizado y 200 µg de ADN portador (ADN de esperma de salmón sometido a esfuerzo cortante). Luego la cubeta de electroporación fue incubada en un baño de agua helada a 16°C por 10 minutos. Luego se aplicó un impulso eléctrico (1100 V/cm) a la cubeta a una capacitancia de 25 µF (no se utilizó ningún resistor de derivación para la electroporación) utilizando un aparato de electroporación Gene Pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA). Luego la cubeta fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, enseguida de lo cual la suspensión celular fue transferida a 50 ml de medio de proteosa modificada y agitada sobre un agitador giratorio por 2 días. Enseguida de la recuperación, las células fueron cosechadas a baja velocidad (4000 rpm), resuspendidas en medio de proteosa modificado y depositadas a baja densidad sobre placas de proteosa modificadas con sacarosa al 1%. Después de 7-10 días de incubación a 25°C en la oscuridad, colonias que representan células transformadas fueron visibles sobre las placas.

Selección de Transformantes y Genotipos: Las colonias fueron proyectadas de placas de proteosa modificadas cultivadas en la oscuridad con sacarosa al 1% y aproximadamente la misma cantidad de células fueron transferidas a placas de 24 cavidades que contienen un 1 ml de medio líquido de proteosa modificada con sacarosa al 1%. Los cultivos fueron mantenidos

en la oscuridad y agitados mediante el agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm durante 5 días.

Para verificar la presencia del gen de invertasa introducido en transformantes de Chlorella, el ADN de cada transformante fue aislado y amplificado con un conjunto de cebadores gen específico (constructo de CMV: cebador delantero (CAACCACGTCTTCAAAGCAA) (SEQ ID NO:6)/ cebador inverso (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO:9), constructos de CV: cebador delantero (TTGTCGGAATGTCATATCAA) (SEQ ID NO: 10)/ cebador inverso (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO: 11), y constructo de HUPl: cebador delantero (AACGCCTTTGTACAACTGCA) (SEQ ID NO: 12)/ cebador inverso (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO: 13)). Para un aislamiento de ADN rápido, un volumen de células (de aproximadamente 5-10 uL de tamaño) fueron resuspendidos en 50 uL de Na-EDTA 10 mM. La suspensión celular fue incubada a 100°C por 10 minutos y sonificada por 10 segundos. Después de la centrifugación a 12000 g por 1 minuto, se usaron 3 uL de sobrenadante para la reacción de PCR. La amplificación de PCR fue efectuada en un ciclizador térmico de ADN (Perkin-Elmer GeneAmp 9600). La mezcla de reacción (50 uL) contenía 3 uL de ADN extraído, 100 pmol cada uno de los cebadores respectivos descritos anteriormente, dNTP 200 uM, 0.5 unidades de ADN polimerasa de Taq (NEB), y solución reguladora de pH de ADN polimerasa Taq de acuerdo con instrucciones del fabricante. La desnaturación de ADN se llevó a cabo a 95°C por

5 minutos durante el primer ciclo y luego durante 30 segundos. El recocido del cebador y reacciones de extensión se llevaron a cabo a 58°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, respectivamente. Los productos de PCR fueron luego visualizados sobre genes de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. La Figura 26 muestra los resultados del genotipo de PCR de transformantes de C. protothecoides utilizando los cebadores gen específicos identificados anteriormente. Las flechas muestran el tamaño esperado de producto de PCR y las estrellas representan muestras de ADN de cada transformante que muestran el producto de PCR coincidente con el tamaño esperado ((V: Vector solamente, WT: tipo silvestre).

Crecimiento en Cultivo Líquido: Después de cinco días de crecimiento en la oscuridad, los transformantes genotipo-positivos mostraron crecimiento sobre medio de proteosa líquido mínimo + sacarosa al 1% en la oscuridad, mientras que las células tipo silvestre no mostraron crecimiento en el mismo medio en la oscuridad.

EJEMPLO 23

Transformación de cepas de algas con una invertasa de S. cerevisiae

Invertasa Secretada: Un gen que codifica una invertasa de sacarosa secretada (número de acceso Gen Bank NP_012104 de Saccharomyces cerevisiae) fue sintetizado de novo

como un fragmento de 1599 bp Asc I-Xho que fue subsecuentemente sub-clonado a un derivado de pUC19 que posee el promotor 35s de Virus de Mosaico de Coliflor y 3' UTR como cassetes de EcoR I/Asc I y Xho/Sac I, respectivamente.

Crecimiento de Células de Algas: Los medios usados en estos experimentos consistían de medios base líquidos (véase EJEMPLO 1) y medios de base sólidos (+ agarosa al 1.5%) que contiene carbono fijo en forma de sacarosa o glucosa (como se designe) a una concentración final de 1%. Las cepas usadas en este experimento no crecieron en la oscuridad sobre medio base en ausencia de una fuente de carbono fijo adicional. Las especies fueron depositadas sobre las placas y cultivadas en la oscuridad a 28°C. Colonias individuales fueron proyectadas y usadas para inocular 500 mL de medio base líquido que contiene glucosa al 1% y se le permite que crezca en la oscuridad hasta fase media-logarítmica, midiendo los conteos celulares cada día. Cada una de las siguientes cepas había sido previamente probada en cuanto a crecimiento sobre sacarosa en la oscuridad como una sola fuente de carbono y no exhibía crecimiento y fueron así excluídas para transformación con una invertasa secretada: (1) Chlorella protothecoides (UTEX 31); (2) Chlorella minutissima (UTEX 2341); y (3) Chlorella emersonii (CCAP 211/15).

Transformación de Células de Algas vía Bombardeo de Partículas: Un cultivo suficiente fue centrifugado para dar

aproximadamente 1-5x10^8 células totales. La pelotilla resultante fue lavada con medio base sin ninguna fuente de carbono fija agregada. Las células fueron centrifugadas otra vez y la pelotilla fue resuspendida en un volumen de medio base suficiente para dar 5x10^7 a 2x10^8 células/ml. 250-1000 µl de células fueron luego depositadas sobre el medio base sólido complementado con sacarosa al 1% y se le permite que seque sobre la placa en una campana estéril. El ADN del plásmido fue precipitado sobre partículas de oro de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Seashell Technology, La Jolla, CA). Las transformaciones se llevaron a cabo utilizando un sistema de administración de partículas BioRad PDS He-1000 utilizando discos de ruptura de 1350 libras fuerza/pulgada^2 (psi) con el conjunto de macroportador ajustado a 9 cm del portador de disco de ruptura. Enseguida de las transformaciones, las placas fueron incubadas en la oscuridad a 28°C. Todas las cepas generaron múltiples colonias transformantes. Las placas de control transformadas sin ningun inserto de invertasa, pero de otra manera preparadas de manera idéntica, no contenían colonias.

Análisis de tranformantes de Chlorella protothecoides: el AND genómico fue extraído de células tipo silvestre de Chlorella protothecoides y colonias transformantes como sigue: las células fueron resuspendidas en 100 ul de solución reguladora del pH de extracción (Tris Cl 87.5 mM, pH

8.0, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0, SDS al 0.25%) e incubadas a 60°C, con mezcla ocasional vía inversión durante 30 minutos. Para PCR, las muestras fueron diluidas 1:100 en Tris Cl 20 mM, pH 8.0.

El Genotipo fue efectuado sobre AND genómico extraído de WT, los transformantes y ADN de plásmido. Las muestras fueron sometidas a genotipo por el gen marcador. Cebadores 2383 (5' CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGC 3') (SEQ ID NO:20) y 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG 3') (SEQ ID NO:21) fueron usados en esta PCR de genotipo. El perfil de PCR usado fue como sigue: desnaturalización a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C-30 segundos, 60°C-30 segundos, 72°C-3 minutos; 72°C-5 minutos. Una banda de tamaño idéntico fue amplificada de los controles positivos (plásmidos) y dos transformantes de Chlorella protothecoides (UTEX 31), como se muestra en la Figura 27.

Análisis de transformante de Chlorella minutissima y Chlorella emersonii: el ADN Genómico fue extraído de WT de Chlorella WT y los transformantes como sigue: las células fueron resuspendidas en 100 ul de solución reguladora del pH de extracción (Tris Cl 87.5 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0, SDS al 0.25%) e incubadas a 60°C con mezcla ocasional vía inversión durante 30 minutos. Para PCR, las muestras fueron diluídas 1:100 en Tris Cl 20 mM, pH 8.0. El Genotipo fue efectuado sobre ADN genómico extraído de WT, los transformantes y ADN de plásmido. Las muestras fueron sometidas a Genotipo en

cuanto al gen marcador. Los cebadores 2336 (5' GTGGCCATATGGACTTACAA 3') (SEQ ID NO:22) y 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG 3') (SEQ ID NO:21) fueron designados como el conjunto de cebador 2 (producto esperado de 1215 bp), en tanto que los cebadores 2465 (5' CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG 3') (SEQ ID NO:23) y 2470 (5' CACCCGTCGTCATGTTCACGGAGCCCAGTGCG 3') (SEQ ID NO:24) fueron designados el conjunto de cebadores 4 (producto esperado de 1442 bp). El perfil de PCR usado fue como sigue: desnaturalización a 94°C por dos minutos; 29 ciclos de 94°C-30 segundos, 60°C-30 segundos, 72°C-1 minuto, 30 segundos; 72°C-5 minutos. Un control de plásmido que contiene la invertasa secretada fue usada como control de PCR. La Figura 28 muestra la transformación de las especies de Chlorella minutissima (UTEX 2341) y Chlorella emersonii (CCAP 21 1/15) de microalgas con el gen que codifica una invertasa secretada.

La secuencia del constructo de invertasa corresponde a SEQ ID NO:25.

EJEMPLO 24

Crecimientos de cepas de algas en comparación con *S. cerevisiae* sobre una materia prima de alimentación celulósica preparada con Celluclast

Cepas y condiciones de cultivo: la cepas de algas utilizadas en este estudio son enlistadas en la tabla 14 a

continuación y fueron cultivadas en medio de Proteosa con material celulósico provisto exógenamente y en algunos casos carbono fijo adicional en forma de glucosa. Se usaron 24 cepas de algas en este estudio, en las que se incluyen 5 géneros diferentes que abarcan 11 especies diferentes de *Chlorella,* dos de *Parachlorella* y *Prototheca* y uno de cada uno de *Bracteococcus* y *Pseudochlorella. Saccharomyces serevisiae* (cepa PJ-69-4A) fue cultivada en medio YPD (por litro, 10g de Bacto-extracto de levadura, 20g Bacto peptona y 20g de glucosa). Tanro las algas como levaduras fueron cultivadas en 28°C en la obscuridad. El crecimiento de esta cepa sobre medio de Proteosa en la obscuridad en ausencia de material celulósico u otro carbono fijo adicional ya sea no ocurrió o fue extremadamente mínimo.

Liberación de glucosa de material celulósico vía tratamiento de despolimerización enzimática: el material de rastrojo de maíz explotado húmedo fue preparado por el National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) al cocinar rastrojo de maíz en una solución de ácido sulfúrico al 1.4% y desaguar la suspensión resultante. Utilizando un analizador de humedad Mettler Toledo Moisture los sólidos secos en el rastrojo de maíz húmedo se determinaron que era de 24%. Una muestra húmeda de 100g fue resuspendida en agua desionizada a un volumen final de 420ml y el pH fue ajustado a 4.8 utilizando NaOH 10N. se agregó Celluclast™ (Novozymas)(una celulasa) a una

concentración final de 4% y la suspensión resultante incubada con agitación a 50°C por 72hrs. El pH de este material fue luego ajustado a 7.5 con NaOH (cambio de volumen despreciable), esterilizado en filtro a través de un filtro de 0.22μm y almacenado a -20°C. Una muestra fue reservada para determinación de concentración de glucosa utilizando un kit a base de hexocinasa de Sigma, como se describe en la presente.

Determinación de concentración de glucosa liberada mediante tratamiento de Celluclast de rastrojo de maíz húmedo: las concentraciones de glucosa fueron determinadas utilizando el reactivo de análisis de glucosa sigma #G3293. Las muestras, tratadas como se resume anteriormente, fueron diluidas 400 veces y se agregaron 40μl a la reacción. Se determinó que la preparación celulósica de rastrojo de maíz contiene aproximadamente 23g/lt de glucosa.

Tabla 14. Cepas de algas cultivadas sobre material prime de alimentación celulósica

Género/especie	Fuente/designación
Bracteoccus minor	UTEX 66
Chlorella ellipsoidea	SAG 2141
Chlorella kessleri	UTEX 1808
Chlorella kessleri	UTEX 397
Chlorella emersonii	CCAP 211/15
Chlorella luteoviridis	SAG 2133
Chlorella luteoviridis	SAG 2198
Chlorella luteoviridis	SAG 2214
Chlorella luteoviridis	UTEX 22
Bracteococcus medionucleatus	UTEX 1244
Chlorella minutissima	CCALA 20024
Chlorella minutissima	UTEX 2341
Chlorella ovalis	CCAP 211/21A
Chlorella protothecoides	CCAP 211/8d
Chlorella protothecoides	UTEX 250
Chlorella saccharophila	UTEX 2911
Chlorella sorokiniana	UTEX 1230
Chlorella sp.	SAG 241.80
Chlorella vulgaris	CCAP 211/11C
Parachlorella kessleri	SAG 12.80
Parachlorella kessleri	SAG 27.87
Prototheca moroformis	UTEX 1441
Prototheca moriformis	UTEX 1434
Pseudochlorella aquatica	SAG 2149

En la tabla 14 y como se usa en la presente, se refiere a la colección de cultivo de alga en la universidad de Texas (Austin, Texas, Estados Unidos de América), SAG se refiere a la colección de cultivos de algas en la universidad de Göttingen (Göttingen, Alemania), CCAP se refiere a la colección de cultivos de algas y protozoarios manejado por la Scottish Association for Marine Science (Escocia, Reino Unido de la Gran Bretaña) y CCALA se refiere a la colección de cultivos de laboratorio algal en el Instituto de Botánica (Trebon, República Checa).

Determinación de crecimiento sobre material

celulósico: después del tratamiento enzimático y sacarificación de celulosa a glucosa, xilosa y otros azúcares de monosacárido, el material preparado anteriormente fue evaluado como materia prima de experimentación par el crecimiento de 24 cepas de algas o *S. cerevisiae* en un medio de Proteosa o medio de YPD respectivamente. El medio de Proteosa fue compensado a una concentración final de glucosa de 23 g/l (la concentración final de glucosa generada vía tratamiento celulolítico de rastrojo de maíz), como fue YPD para el cultivo de *S. cerevisiae*, al agregar cantidades variables de glucosa pura y/o material celulósico depolimerizado. Se incluyeron concentraciones variables de material celulósico, proporcionando 0, 12.5, 25, 50 y 100% de la glucosa de 23 g/l en cada medio, los componentes del cual son mostrados en la tabla 15 a continuación. Un ml de los medios apropiados fue agregado a las cavidades de una placa de 24 cavidades. *S. cerevisiae* cultivado heterotróficamente a 28°C en YPD sirvió como inoculo (20µl) para las cavidades de levadura. 20 microlitros de inoculo para las 24 cepas de algas fueron provistos por las células de algas cultivados mixotróficamente en un medio de Proteosa que contiene 20g/l de glucosa.

Tabla 15. Preparaciones de materia prima de alimentación celulósica.

Vol. de YPD 23.1 g/l de glucosa (ml)	Vol. De medio de Proteosa 23.1 g/l de glucosa (ml)	Vol. De 100% de celulósicos compensados al medio de Proteosa (ml)	Vol. De 100% de celulósicos compensados a YPD (ml)	Vol. Final (ml)	Porciento de celulósicos
0	1	0	0	1	0
0	0.875	0.125	0	1	12.5
0	0.75	0.25	0	1	25
0	0.5	0.5	0	1	50
0	0	1	0	1	100
1	0	0	0	1	0
0.875	0	0	0.125	1	12.5
0.75	0	0	0.25	1	25
0.5	0	0	0.5	1	50
0	0	0	1	1	100

YPD, respectivamente para producir medios que contienen el porcentaje indicado de celulósicos. Los medios fueron preparados con el fin obtener una concentración de glucosa final de 23 g/l en todos los casos. El volumen de los medios antes de la adición ya sea de 20µl de levadura o células de algas cultivadas en fase medio-logaritmica fue de 1ml. Las células fueron incubadas dos días en la obscuridad sobre las concentraciones variables de materias primar de alimentación celulósicas a 28°C con agitación (300rpm). El crecimiento fue determinado mediante medición de absorbancia a 750nm en un espectrofotómetro UV. Sorprendentemente, todas las cepas crecieron sobre el material celulósico preparado con Celluclast, incluyendo condiciones de medios en las cuales el 100% del azúcar fermentable fue celulósico-fermentable.

EJEMPLO 25

Crecimiento de 24 cepas de algas y *S. cerevisiae* sobre varias materias primas de alimentación celulósicas preparadas con Accellerase 1000™ y Celluclast™

Cepas y condiciones de cultivo: las cepas de algas usadas en este ejemplo son enlistadas en la tabla 14 (anterior) y fueron cultivadas en un medio de Proteosa más carbono fijo adicional en forma de material celulósico despolimerizado y/o glucosa pura. *Saccharomyces cerevisiae* (cepa pJ69-4a) fue cultivado en un medio de YPD más carbono fijo adicional en forma de material celulósico despolimerizado y/o glucosa pura. Tanto las algas como levaduras fueron cultivadas a 28°C en la obscuridad.

Liberación de glucosa del material celulósico vía tratamiento de despolimerización enzimática: el material de rastrojo de maíz explotado húmedo fue preparado por la National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) al cocinar rastrojo de maíz en una solución de ácido sulfúrico al 1.4% y desaguar la suspensión resultante. También se preparó Pasto varilla por el National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) utilizando el mismo método como para el rastrojo de maíz. Pulpa de remolacha de azúcar, generada vía tratamiento con pectinasa, fue suministrada por Atlantic Biomasa, Inc. Of Frederick, MD. Utilizando un analizador de humedad de Mettler Toledo, los sólidos secos fueron 24% en el rastrojo de maíz húmedo, 26% en

el Pasto varilla y 3.5% en la pulpa de remolacha de azúcar. Una muestra húmeda de 100g de rastrojo de maíz o Pasto varilla fue resuspendida en agua desionizada a un volumen final de 420ml y el pH ajustado a 4.8 utilizando NaOH 10N. Para pulpa de remolacha, 8.8g de sólidos secos fueron traídos a 350ml con agua desionizada y el pH ajustado a 4.8 NaOH 10N. Para todas las materias primas de alimentación, Accellerase 1000™ (Genencor) (un complejo de enzima de celulasa) fue usado a una proporción de 0.25ml de enzima por gramo de biomasa seca. Las muestras fueron incubadas con agitación (110rpm) a 50°C por 72hrs. El pH de este material fue luego ajustado a 7.5 con NaOH (cambio de volumen despreciable), esterilizado en filtro a través de un filtro de 0.22μm y usado en experimentos de cultivo resumidos a continuación. Una muestra fue reservada para la determinación de concentración de glucosa utilizando un kit a base de hexocinasa de Sigma, como se describe posteriormente en la presente. El mismo conjunto de materias primas de alimentación celulósica fue también preparado utilizando Celluclast™ (Novozymes) (una celulasa) como se describe en el ejemplo previo.

Determinación de concentraciones de glucosa en varias materias primas de alimentación celulósicas tratadas con Accellerase 1000: las concentraciones de glucosa fueron determinadas utilizando el reactivo de análisis de Sigma #G3293. Las muestras tratadas como se resume anteriormente,

fueron diluidas 400 veces y se agregaron 40µl a la reacción. Las preparaciones celulósicas de rastrojo de maíz, Pasto varilla y pulpa de remolacha fueron determinadas que contienen aproximadamente 23.6, 17.1 y 13.7 g/l de glucosa respectivamente.

Determinación de crecimientos sobre material celulósico: después de la despolimerización enzimática de fuentes de glucosa, xilosa y otros monosacáridos, los materiales preparados anteriormente fueron evaluados como materias primas de la alimentación para el crecimiento de las 24 cepas de algas enlistadas en la tabla 14 y *S. cerevisiae* en Proteosa o medio de YPD respectivamente. Los medios fueron diseñados para contener una concentración consistente de glucosa en tanto que se hace variar la cantidad de material celulósico derivado de rastrojo de maíz, Pasto varilla o pulpa de remolacha. Un primer conjunto de Proteosa y medio de YPD que contiene 23.6g g/L de glucosa pura, en tanto que un segundo conjunto de medios contenía rastrojo de maíz despolimerizado, Pasto varilla y pulpa de remolacha, cada uno de los cuales contenía 23.6 g/l de glucosa. El Pasto varilla y medios de pulpa de remolacha fueron complementados con 6.5 a 9.9 gr/l de glucosa pura para normalizar la glucosa en todos los medios celulósicos a 23.6 gr/l. un ml del medio apropiado fue agregado a las cavidades de una placa de 24 cavidades. *S. cerevisiae* cultivado heterotróficamente a 28°C en YPD sirvió como inoculo

(20μl) para las cavidades de levadura. Veinte microlitros de inoculo para las 24 cepas de algas fueron provistos por las células de algas cultivadas mixotrópicamente en un medio de Proteosa que contiene 20 g/l de glucosa. Todas las células fueron incubadas dos días en la oscuridad en concentraciones variables de materias primas de alimentación celulósica a 28°C con agitación (300rpm). El crecimiento fue determinado mediante medición de absorbancia a 750nm en un espectrofotómetro UV. Sorprendentemente, todas las cepas de algas crecieron sobre el rastrojo de maíz, Pasto varilla y material de pulpa de remolacha preparado con Accellerase 1000™ o Celluclast™, incluyendo condiciones del medios en las cuales el 100% de azúcar fermentable fue celulósico-derivado. Bajo ninguna combinación de materia prima de alimentación celulósica y enzima de despolimerización *S. cerevisiae* superó el crecimiento en una cantidad equivalente de glucosa pura, indicando que los inhibidores al crecimiento de levadura en el material celulósico hacen un impacto mayor sobre la productividad de la fermentación. Combinaciones de cepas de algas, enzimas de despolimerización y materias primas de alimentación con monosacáridos celulósicos-derivados 100% que superaron el desempeño a glucosa pura 100% son mostradas en la tabla 16.

Tabla 16. Combinaciones de algas, enzimas y materias primas de alimentación

Materia prima de alimentación y enzima de despolimerización	Genero/especie	Fuente /designación
Rastrojo de maíz / Celluclast™	*Bracteococcus minor*	UTEX 66
Pulpa de remolacha/Accellerase™	*Chlorella ellipsoidea*	SAG 2141
Pasto varilla/ Accellerase™	*Chlorella kessleri*	UTEX 252
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Chlorella kessleri*	UTEX 397
Pasto varilla/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2133
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2133
Pasto varilla/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Rastrojo de maíz/ Accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Pulpa de romolacha/ Accellerase™	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Chlorella sp.*	SAG 241.80
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Swithgrass/ Accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Rastrojo de maíz/ Accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Rastrojo de maíz/Celluclast™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Rastrojo de maíz/ Accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1434
Pulpa de remolacha/ Accellerase™	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149

EJEMPLO 26

Tamices de utilización de carbono

Cepas y condiciones de cultivo: cultivos de semilla de las varias cepas de microalgas identificadas a continuación fueron iniciados como cultivos líquidos de 1ml en placas de 24

cavidades y fueron cultivadas autotróficamente por 48hrs en la luz, agitando ~350rpm. Las placas fueron ajustadas con un medio de Proteosa solido a base de agarosa al 1.5% que contiene 1% de glucosa, glicerol, xilosa, sacarosa, fructosa, arabinosa, manosa, galactosa o acetato como la única fuente de carbono fijo. Para cada cepa, 5µl de cultivo de la placa de 24 cavidades autotrópica fueron depositados sobre los medios sólidos. Las placas fueron incubadas por 7 días en la oscuridad a 28°C y examinadas en cuanto a crecimiento en comparación con una placa de control que no contiene carbono fijo adicional. El crecimiento fue observado para cada una de las especies probadas con cada materia prima de alimentación respectiva como se muestra en la tabla 17 de a continuación. El crecimiento de estas cepas sobre un medio de Proteosa en la oscuridad en ausencia de carbono fijo adicional no ocurrió o fue extremadamente mínimo.

Tabla 17. Especies de algas cultivadas sobre varias materias primas de alimentación de carbono fijo

Fuente de carbono fijo	Género/especie	Fuente /designación
Glucosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Glucosa	*Chlorella kessleri*	UTEX 397
Glucosa	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 2805
Glucosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Glucosa	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149
Glucosa	*Chlorella reisiglii*	CCAP 11/8
Glucosa	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Glucosa	*Prototheca stagnora*	UTEX 1442
Glucosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1434
Glucosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Glucosa	*Scenedesmus rubescens*	CCAP 232/1
Glicerol	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Glicerol	*Chlorella protothecoides*	CCAP 211/8d
Glicerol	*Bracteococcus medianucletus*	UTEX 1244
Glicerol	*Prototheca moriformis*	UTEX 288
Glicerol	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Glicerol	*Chlorella minutissima*	UTEX 2341
Glicerol	*Chlorella sp.*	CCAP 211/61
Glicerol	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1663
Xilosa	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2133
Xilosa	*Chlorella ellipsoidea*	SAG 2141
Xilosa	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149
Xilosa	*Chlorella sp.*	CCAP 211/75
Xilosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Xilosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Sacarosa	*Chlorella saccharophila*	UTEX 2469
Sacarosa	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Sacarosa	*Chlorella sp.*	UTEX EE102
Sacarosa	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2198
Sacarosa	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Sacarosa	*Chlorella minutissima*	CCALA 20024
Fructosa	*Chlorella kessleri*	UTEX 398
Fructosa	*Chlorella trebouxiodes*	SAG 3.95
Fructosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 27.87
Fructosa	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2214
Fructosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 31
Fructosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250

Fructosa	*Chlorella reisiglii*	CCAP 11/8
Fructosa	*Chlorella protothecoides*	CCAP 211/8d
Fructosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Fructosa	*Scenedesmus rubescens*	CCAP 232/1
Arabinosa	*Chlorella sp*	CCAP 211/75
Manosa	*Chlorella kessleri*	UTEX 263
Manosa	*Chlorella saccharophila*	UTEX 2911
Manosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Manosa	*Chlorella sp.*	SAG 241.80
Manosa	*Chlorella angustoellipsoidea*	SAG 265
Manosa	*Chlorella ellipsoidea*	SAG 2141
Manosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Manosa	*Chlorella emersonii*	CCAP 211/15
Manosa	*Bracteococcus minor*	UTEX 66
Manosa	*Prototheca stagnora*	UTEX 1442
Manosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1439
Manosa	*Chlorella cf. minutissima*	CCALA 20024
Manosa	*Scenedesmus rubescens*	CCAP 232/1
Galactosa	*Bracteococcus minor*	UTEX 66
Galactosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 14.82
Galactosa	*Parachlorella beijerinckii*	SAG 2046
Galactosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 25
Galactosa	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1602
Galactosa	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Galactosa	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149
Galactosa	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2214
Galactosa	*Chlorella ellipsoidea*	CCAP 211/42
Galactosa	*Chlorella ellipsoidea*	CCAP 211/50
Galactosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Galactosa	*Chlorella protothecoides*	UTEX 264
Galactosa	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Galactosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1439
Galactosa	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Galactosa	*Chlorella kessleri*	CCALA 252
Acetato	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1230
Acetato	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1810
Acetato	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Acetato	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80

Acetato	*Parachlorella kessleri*	SAG 27.87
Acetato	*Chlorella sp.*	SAG 241.80
Acetato	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2214
Acetato	*Chlorella protothecoides*	UTEX 31
Acetato	*Chlorella protothecoides*	UTEX 411
Acetato	*Chlorella ellipsoidea*	CCAP 211/42
Acetato	*Chlorella ovalis*	CCAP 211/21A
Acetato	*Chlorella protothecoides*	CCAP 211/8d
Acetato	*Prototheca stagnora*	UTEX 1442
Acetato	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Acetato	*Chlorella sorokiniana*	CCALA 260
Acetato	*Chlorella vulgaris*	CCAP 211/79
Acetato	*Paraclorella kessleri*	SAG 14.82

EJEMPLO 27

Producción de diesel renovable

Producción de células: se usó un lote de tanque F de *Chlorella protethecoides* (UTEX 250) (aproximadamente 1200 galones) se permite que el lote se ponga en operación (#ZA07126) por 100hrs, mientras se controlan los niveles de glucosa a 16 g/l después de lo cual se termina la alimentación de jarabe de maíz. Los niveles de glucosa residuales cayeron a <0 g/l dos horas después. Esto dio como resultado una edad final de 102hrs. El volumen final del caldo fue de 4542 L (1120 galones). Tanto verificaciones de contaminación en proceso como un análisis completo de una muestra final de caldo fallaron en demostrar algún signo de contaminación. El caldo de fermentación fue centrifugado y secado en tambor. Las células secadas en tambor fueron resuspendidas en hexano y homogenizadas a aproximadamente 1000bar. Luego se efectuó la

extracción de hexano usando métodos estándar y el aceite triglicérido de algas resultante fue determinado estar libre de hexano residual.

Producción de diesel renovable: el aceite de triglicérido de algas tenía un perfil de lípidos de aproximadamente (3% C18:0, 71% C18:1, 15% C18:2, 1% C18:3, 8% C16:0 y 2% de otros componentes. El aceite fue sometido primero a hidrocracking dando como resultado una pérdida de rendimiento de aproximadamente 20% a agua y gases. Luego se llevó a cabo la hidroisomerización con una pérdida aproximada de 10% en rendimiento a gases. Luego se efectúo una primera destilación para remover la fracción de naptha, dejando el producto deseado. Aproximadamente 20% del material se perdió a naptha en esta primera destilación. Luego se llevó a cabo una segunda destilación a una temperatura suficiente para remover fracciones necesarias para cumplir con la especificación D975 de ASTM pero dejando una fracción del fondo que no cumple con el punto de 90% para la destilación de D975. Aproximadamente 30% del material fue dejado en la fracción del fondo en la segunda destilación. El material resultante fue luego probado para todas las especificaciones de D975 de ASTM.

Las figuras 29 y 30 ilustran un cromatógrafo de gases y una grafica de distribución del punto de ebullición, respectivamente del producto de diesel renovable final producido mediante el método de la invención. La tabla 18

muestra la distribución del punto de ebullición del producto de diesel renovable resultante y la tabla 19 muestra los resultados de un análisis de producto final en cuanto a cumplimiento con las especificaciones D975 de ASTM.

Tabla 18. Distribución del punto de ebullición de producto de diesel renovable. PB = punto de ebullición

% masa recuperada	PB °C	% masa recuperada	PB °C	% masa recuperada	PB °C	% masa recuperada	PB °C
IBP	150.4	26.0	261.8	52.0	303.8	78.0	315.8
1.0	163.6	27.0	264.6	53.0	304.4	79.0	316.4
2.0	173.4	28.0	266.2	54.0	304.8	80.0	317.0
3.0	175.2	29.0	268.2	55.0	305.2	81.0	317.6
4.0	188.0	30.0	271.0	56.0	305.6	82.0	318.4
5.0	194.8	31.0	272.4	57.0	306.0	83.0	319.0
6.0	196.6	32.0	273.4	58.0	306.4	84.0	319.6
7.0	197.8	33.0	276.2	59.0	306.6	85.0	320.2
8.0	207.4	34.0	280.0	60.0	307.0	86.0	320.8
9.0	210.0	35.0	282.4	61.0	307.4	87.0	321.2
10.0	214.4	36.0	285.2	62.0	307.6	88.0	321.8
11.0	216.6	37.0	287.8	63.0	308.0	89.0	322.2
12.0	217.6	38.0	289.6	64.0	308.4	90.0	322.4
13.0	221.4	39.0	291.8	65.0	308.8	91.0	322.8
14.0	227.6	40.0	294.2	66.0	309.2	92.0	323.2
15.0	229.8	41.0	295.8	67.0	309.6	93.0	324.4
16.0	233.2	42.0	296.8	68.0	310.2	94.0	326.8
17.0	235.8	43.0	297.6	69.0	310.6	95.0	329.4
18.0	236.8	44.0	298.4	70.0	311.2	96.0	333.6
19.0	240.2	45.0	299.2	71.0	311.6	97.0	339.4
20.0	245.6	46.0	299.8	72.0	312.2	98.0	346.2
21.0	248.0	47.0	300.6	73.0	313.0	99.0	362.8
22.0	250.2	48.0	301.2	74.0	313.6	FBP	401.4
23.0	253.6	49.0	302.0	75.0	314.2		
24.0	255.2	50.0	302.6	76.0	314.8		
25.0	256.8	51.0	303.2	77.0	315.4		

Tabla 19. Reporte analítico para producto de diesel renovable utilizando especificaciones D975.

Método de número	Descripción de prueba	Resultados	Unidades
D93A	Punto de inflamación (PMCC)	70	°C
D2709	Agua y sedimentos	0	Vol %
D86	90% de destilación (recuperado)	301.0/573.9	°C/°F
D445	Viscosidad cinemática @ 40.0°C (104.0°F)	2.868	mm2/seg
D482	Azufre	<0.001	Peso %
D5453	Sulfuro	2.4	ppm
D130	Corrosión de cobre 3hrs @ 50°C	Lb	
D613	Número de cetano***	>65	
D976	Índice de cetano calculado	71.2	
D2500	Punto de turbidez	-3	°C
D524	Residuo de carbono de 10% de Ramsbotton	0.02	Peso%
D97	Punto de fluidez	-3	°C
D2274	Insolubles totales (estabilidad de oxidación) prueba de 40hrs ***	4.0	mg/100ml
D4052	Densidad @15.0°C (59.0°F)	793.8	Kg/mt3
D4176-1	Apariencia mediante inspección visual (lab)	Claro y brillante/ pasa	Visual
D4176-1	Apariencia mediante inspección visual (lab)	Libre de agua /pasa	Visual
D4176-1	Apariencia mediante inspección visual (lab)	Partículas /pasa	Visual
D1500	Color ASTM	L0.5	
D664	Número de ácido	<0.10	mg KOH/g
D6079	Lubricidad (marca de desgaste)	405	μm

SECUENCIAS

SEQ ID NO:1

Promotor HUP de Chlorella (subsecuencia de número de acceso GenBank X55349):

gatcagacgggcctgacctgcgagataatcaagtgctcgtaggcaaccaactcagcagctgcttggtgttgggtctgcaggatagtgtt
gcagggccccaaggacagcaggggaacttacaccttgtccccgacccagttttatggagtgcattgcctcaagagcctagccggagc
gctaggctacatacttgccgcaccggtatgaggggatatagtactcgcactgcgctgtctagtgagatgggcagtgctgcccataaac
aactggctgctcagccatttgttggcggaccattctgggggggccagcaatgcctgactttcgggtagggtgaaaactgaacaaagac
taccaaaacagaatttcttcctccttggaggtaagcgcaggccggcccgcctgcgcccacatggcgctccgaacacctccatagctgt
aagggcgcaaacatggccggactgttgtcagcactctttcatggccatacaaggtcatgtcgagattagtgctgagtaagacactatca
ccccatgttcgattgaagccgtgacttcatgccaacctgcccctgggcgtagcagacgtatgccatcatgaccactagccgacatgcg
ctgtcttttgccaccaaaacaactggtacaccgctcgaagtcgtgccgcacacctccgggagtgagtccggcgactcctccccggcg
ggccgcggccctacctgggtagggtcgccatacgcccacgaccaaacgacgcaggaggggattggggtagggaatcccaaccag
cctaaccaagacggcacctataataataggtgggggactaacagccctatatcgcaagctttgggtgcctatcttgagaagcacgag
ttggagtggctgtgtacggtcgaccctaaggtgggtgtgccgcagcctgaaacaaagcgtctagcagctgcttctataatgtgtcagcc
gttgtgtttcagttatattgtatgctattgtttgttcgtgctagggtggcgcaggcccacctactgtggcgggccattggttggtgcttgaatt
gcctcaccatctaaggtctgaacgctcactcaaacgcctttgtacaactgcagaactttccttggcgctgcaactacagtgtgcaaacca
gcacatagcactcccttacatcacccagcagtacaaca

SEQ ID NO:2

Promotor de Chlorella ellipsoidea nitrato reductasa de AY307383:

cgctgcgcaccagggccgccagctcgctgatgtcgctccaaatgcggtcccccgatttttgttcttcatcttctccaccttggtggccttc
ttggccagggccttcagctgcatgcgcacagaccgttgagctcctgatcagcatcctcaggaggccctttgacaagcaagcccctgtg
caagcccattcacggggtaccagtggtgctgaggtagatgggtttgaaaaggattgctcggtcgattgctgctcatggaattggcatgt
gcatgcatgttcacaatatgccaccaggctttggagcaagagagcatgaatgccttcaggcaggttgaaagttcctgggggtgaagag
gcagggccgaggattggaggaggaaagcatcaagtcgtcgctcatgctcatgttttcagtcagagtttgccaagctcacaggagcag
agacaagactggctgctcaggtgttgcatcgtgtgtgtggtgggggggggggggttaatacggtacgaaatgcacttggaattcccac
ctcatgccagcggacccacatgcttgaattcgaggcctgtggggtgagaaatgctcactctgccctcgttgctgaggtacttcaggccg
ctgagctcaaagtcgatgccctgctcgtctatcagggcctgcacctctgggctgaccggctcagcctccttcgcgggcatggagtagg
cgccggcagcgttcatgtccgggcccagggcagcggtggtgccataaatgtcggtgatggtggggaggggggccgtcgccacacc
attgccgttgctggctgacgcatgcacatgtggcctggctggcaccggcagcactggtctccagccagccagcaagtggctgttcag
gaaagcggccatgttgttggtccctgcgcatgtaattccccagatcaaaggagggaacagcttggatttgatgtagtgcccaaccgga
ctgaatgtgcgatggcaggtccctttgagtctcccgaattactagcagggcactgtgacctaacgcagcatgccaaccgcaaaaaaat
gattgacagaaaatgaagcggtgtgtcaatatttgctgtatttattcgttttaatcagcaaccaagttcgaaacgcaactatcgtggtgatca
agtgaacctcatcagacttacctcgttcggcaaggaaacggaggcaccaaattccaatttgatattatcgcttgccaagctagagctgat

ctttgggaaaccaactgccagacagtggactgtgatggagtgccccgagtggtggagcctcttcgattcggttagtcattactaacgtg
aaccctcagtgaagggaccatcagaccagaaagaccagatctcctcctcgacaccgagagagtgttgcggcagtaggacgacaag

SEQ ID NO:3

B. braunii malato deshidrogenasa 5'UTR:

aattggaaaccccgcgcaagaccgggttgtttggccgcctgaccggaaaggggggggcctgtcccgaaggggtctatctcttgggg
gatgtcgggcgcggaaagtcgatgttgatggacctcttcttcgaccatgtcggggtcgaggccaagagccgcgtccatttcgccgagt
tcatgatggaggtgaatgaccgcatcgccaccgaacgcgccaagaagcgggcgaccgatcgcccccgtcgctgcagcccttgccg
aggaagtccggctgctggcgttcgacgagatgatggtgacgaacagcccggacgcgatgatcctgtcgcggctgttcaccgcgctg
atcgaggcgggggtgacgatcgtcaccacctccaaccggccgcccagggatctctataagaacgggctcaaccgcgagcatttcct
gcccttcatcgcgctgatcgaggcgcggctggacgtgctggcgctgaacggcccgaccgactatcggcgcgaccggctggggcg
gctggacacgtggttggtgcccaatggccccaaggcgacgattaccttgtcggcggcgttcttccgcctgaccgactatccggtcgag
gatgccgcgcatgtgccctctgaggacctgaaggtgggcgggcgcgtgctgaatgtccccaaggcgctgaagggcgtcgcggtctt
ctcgttcaagcggttgtgcggcgaagcgcgggggggcggcggactatctggcggtcgcgcggggcttccacaccgtcatcctggtcg
gaatccccaagctgggggcggagaaccgcaacgaggcggggcgcttcgtccagctgatcgacgcgctctacgaacataaggtcaa
gctgctcgccgcagccgatgccagcccgccgaactctatgaaaccggcgacggccggttcgagtttgagcgcagatcagccggttg
gaagagatgcgctccgaggattatctggcccaaggccatggctcggaggggccttgatcaggccttaatgcacttcgcaaccattatc
gtttaaaatcttaaactctgtggaataacggttccccgacgccgcaatacacgtacgtccactacggagtaggattgga

SEQ ID NO:4

Promotor de Chlamydomonas RBCS2:

cgcttagaagatttcgataaggcgccagaaggagcgcagccaaaccaggatgatgtttgatggggtatttgagcacttgcaaccccttat
ccggaagccccctggcccacaaaggctaggcgccaatgcaagcagttcgcatgcagcccctggagcggtgccctcctgataaaacc
ggccaggggggcctatgttctttacttttttacaagagaagtcactcaacatcttaaacggtcttaagaagtctatccgg

SEQ ID NO:5

CMV-Hyg-CMV BamHI-SacII cassette de pCAMBIA:

ggatccccgggaattcggcgcgccgggcccaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctca
gaagaccaaagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatca
aaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgaca
gtggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgat
gtgataacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgagacttttc
aacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaaggtgg
cacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccaccc
acgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatg

acgcacaatcccactatccttcgcaagaccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctgaaatcaccagtctctct
ctacaaatctatctctctcgagctttcgcagatcccgggggggcaatgagatatgaaaaagcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaa
gtttctgatcgaaaagttcgacagcgtctccgacctgatgcagctctcggagggcgaagaatctcgtgctttcagcttcgatgtaggag
ggcgtggatatgtcctgcgggtaaatagctgcgccgatggtttctacaaagatcgttatgtttatcggcactttgcatcggccgcgctccc
gattccggaagtgcttgacattggggagtttagcgagagcctgacctattgcatctcccgccgtgcacagggtgtcacgttgcaagacc
tgcctgaaaccgaactgcccgctgttctacaaccggtcgcggaggctatggatgcgatcgctgcggccgatcttagccagacgagcg
ggttcggcccattcggaccgcaaggaatcggtcaatacactacatggcgtgatttcatatgcgcgattgctgatccccatgtgtatcact
ggcaaactgtgatggacgacaccgtcagtgcgtccgtcgcgcaggctctcgatgagctgatgctttgggccgaggactgccccgaa
gtccggcacctcgtgcacgcggatttcggctccaacaatgtcctgacggacaatggccgcataacagcggtcattgactggagcgag
gcgatgttcggggattcccaatacgaggtcgccaacatcttcttctggaggccgtggttggcttgtatggagcagcagacgcgctactt
cgagcggaggcatccggagcttgcaggatcgccacgactccgggcgtatatgctccgcattggtcttgaccaactctatcagagcttg
gttgacggcaatttcgatgatgcagcttgggcgcagggtcgatgcgacgcaatcgtccgatccggagccgggactgtcgggcgtaca
caaatcgcccgcagaagcgcggccgtctggaccgatggctgtgtagaagtactcgccgatagtggaaaccgacgccccagcactc
gtccgagggcaaagaaatagagtagatgccgaccggatctgtcgatcgacaagctcgagtttctccataataatgtgtgagtagttccc
agataagggaattagggttcctatagggtttcgctcatgtgttgagcatataagaaacccttagtatgtatttgtatttgtaaaatacttctatc
aataaaatttctaattcctaaaaccaaaatccagtactaaaatccagatcccccgaattaattcggcgttaattcagtacattaaaaacgtcc
gcaatgtgttattaagttgtctaagcgtcaatttgtttacaccacaatatatcctgccaccagccagccaacagctccccgaccggcagct
cggcacaaaatcaccactcgatacaggcagcccatcagtccgggacggcgtcagcgggagagccgttgtaaggcggcagactttg
ctcatgttaccgatgctattcggaagaacggcaactaagctgccgggtttgaaacacggatgatctcgcggagggtagcatgttgattg
taacgatgacagagcgttgctgcctgtgatcaccgcgg

SEQ ID NO:6

caaccacgtcttcaaagcaa

SEQ ID NO:7

agcaatcgcgcatatgaaat

SEQ ID NO:8

ATGCTTCTTCAGGCCTTTCTTTTTCTTCTTGCTGGTTTTGCTGCCAAGATCAGCGCC
TCTATGACGAACGAAACCTCGGATAGACCACTTGTGCACTTTACACCAAACAAG
GGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACGAAAAAGATGCCAAGTGG
CATCTGTACTTTCAATACAACCCGAACGATACTGTCTGGGGGACGCCATTGTTTT
GGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAATTGGGAGGACCAACCAATAGCTA
TCGCTCCGAAGAGGAACGACTCCGGAGCATTCTCGGGTTCCATGGTGGTTGACTA
CAACAATACTTCCGGCTTTTTCAACGATACCATTGACCCGAGACAACGCTGCGTG

GCCATATGGACTTACAACACACCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCGTATAGC
CTGGACGGTGGATACACTTTTACAGAGTATCAGAAGAACCCTGTGCTTGCTGCAA
ATTCGACTCAGTTCCGAGATCCGAAGGTCTTTTGGTACGAGCCCTCGCAGAAGTG
GATCATGACAGCGGCAAAGTCACAGGACTACAAGATCGAAATTTACTCGTCTGA
CGACCTTAAATCCTGGAAGCTCGAATCCGCGTTCGCAAACGAGGGCTTTCTCGGC
TACCAATACGAATGCCCAGGCCTGATAGAGGTCCCAACAGAGCAAGATCCCAGC
AAGTCCTACTGGGTGATGTTTATTTCCATTAATCCAGGAGCACCGGCAGGAGGTT
CTTTTAATCAGTACTTCGTCGGAAGCTTTAACGGAACTCATTTCGAGGCATTTGAT
AACCAATCAAGAGTAGTTGATTTTGGAAAGGACTACTATGCCCTGCAGACTTTCT
TCAATACTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGCATTGCGTGGGCTTCTAACTG
GGAGTATTCCGCATTCGTTCCTACAAACCCTTGGAGGTCCTCCATGTCGCTCGTG
AGGAAATTCTCTCTCAACACTGAGTACCAGGCCAACCCGGAAACCGAACTCATA
AACCTGAAAGCCGAACCGATCCTGAACATTAGCAACGCTGGCCCCTGGAGCCGG
TTTGCAACCAACACCACGTTGACGAAAGCCAACAGCTACAACGTCGATCTTTCGA
ATAGCACCGGTACACTTGAATTTGAACTGGTGTATGCCGTCAATACCACCCAAAC
GATCTCGAAGTCGGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTTAAAGGCCTGGAAGAC
CCCGAGGAGTACCTCAGAATGGGTTTCGAGGTTTCTGCGTCCTCCTTCTTCCTTGA
TCGCGGGAACAGCAAAGTAAAATTTGTTAAGGAGAACCCATATTTTACCAACAG
GATGAGCGTTAACAACCAACCATTCAAGAGCGAAAACGACCTGTCGTACTACAA
AGTGTATGGTTTGCTTGATCAAAATATCCTGGAACTCTACTTCAACGATGGTGAT
GTCGTGTCCACCAACACATACTTCATGACAACCGGGAACGCACTGGGCTCCGTGA
ACATGACGACGGGTGTGGATAACCTGTTCTACATCGACAAATTCCAGGTGAGGG
AAGTCAAGTGA

SEQ ID NO:9

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

SEQ ID NO:10

TTGTCGGAATGTCATATCAA

SEQ ID NO:11

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

SEQ ID NO:12

AACGCCTTTGTACAACTGCA

SEQ ID NO:13

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

SEQ ID NO:14

MTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEKDAKWHLYFQYNPNDTVWGTPLF
WGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFSGSMVVDYNNTSGFFNDTIDPRQRCVAI
WTYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFWYEPSQKWIMT
AAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPGLIEVPTEQDPSKSYWVM
FISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYYALQTFFNTDPTYGS
ALGIAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILNISN
AGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFK
GLEDPEEYLRMGFEVSASSFFLDRGNSKVKFVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSY
YKVYGLLDQNILELYFNDGDVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVR
EVK

SEQ ID NO:15

MLLQAFLFLLAGFAAKISAS

SEQ ID NO:16

MANKSLLLLLLLGSLASG

SEQ ID NO:17

MARLPLAALG

SEQ ID NO:18

MANKLLLLLLLLLLPLAASG

SEQ ID NO:19

MLLQAFLFLLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEKDAKWHLYF
QYNPNDTVWGTPLFWGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFSGSMVVDYNNTSGFFND
TIDPRQRCVAIWTYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFWYEPSQ
KWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPGLIEVPTEQDPSKSYWV
MFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYYALQTFFNTDPTYGSALG
IAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILNISNAGPWSRF
ATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFKGLEDPEEYLRMG

FEVSASSFFLDRGNSKVKFVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYYKVYGLLDQNILELYFN
DGDVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVREVK

SEQ ID NO:20

CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGC

SEQ ID NO:21

CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG

SEQ ID NO:22

GTGGCCATATGGACTTACAA

SEQ ID NO:23

CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG

SEQ ID NO:24

CACCCGTCGTCATGTTCACGGAGCCCAGTGCG

SEQ ID NO:25

gaattccccaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgaga
cttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaag
gtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccc
acccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgaacatggtggagcacgac
actctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaac
ctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgat
aaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaaga
agacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgca
agaccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctgaaatcaccagtctctctctacaaatctatctctggcgcgcc
atatcaATGCTTCTTCAGGCCTTTCTTTTTCTTCTTGCTGGTTTTGCTGCCAAGATCAG
CGCCTCTATGACGAACGAAACCTCGGATAGACCACTTGTGCACTTTACACCAAAC
AAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACGAAAAAGATGCCAAG
TGGCATCTGTACTTTCAATACAACCCGAACGATACTGTCTGGGGGACGCCATTGT
TTTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAATTGGGAGGACCAACCAATAG
CTATCGCTCCGAAGAGGAACGACTCCGGAGCATTCTCGGGTTCCATGGTGGTTGA
CTACAACAATACTTCCGGCTTTTTCAACGATACCATTGACCCGAGACAACGCTGC
GTGGCCATATGGACTTACAACACACCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCGTAT
AGCCTGGACGGTGGATACACTTTTACAGAGTATCAGAAGAACCCTGTGCTTGCTG
CAAATTCGACTCAGTTCCGAGATCCGAAGGTCTTTTGGTACGAGCCCTCGCAGAA
GTGGATCATGACAGCGGCAAAGTCACAGGACTACAAGATCGAAATTTACTCGTC

TGACGACCTTAAATCCTGGAAGCTCGAATCCGCGTTCGCAAACGAGGGCTTTCTC
GGCTACCAATACGAATGCCCAGGCCTGATAGAGGTCCCAACAGAGCAAGATCCC
AGCAAGTCCTACTGGGTGATGTTTATTTCCATTAATCCAGGAGCACCGGCAGGAG
GTTCTTTTAATCAGTACTTCGTCGGAAGCTTTAACGGAACTCATTTCGAGGCATTT
GATAACCAATCAAGAGTAGTTGATTTTGGAAAGGACTACTATGCCCTGCAGACTT
TCTTCAATACTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGCATTGCGTGGGCTTCTAA
CTGGGAGTATTCCGCATTCGTTCCTACAAACCCTTGGAGGTCCTCCATGTCGCTC
GTGAGGAAATTCTCTCTCAACACTGAGTACCAGGCCAACCCGGAAACCGAACTC
ATAAACCTGAAAGCCGAACCGATCCTGAACATTAGCAACGCTGGCCCCTGGAGC
CGGTTTGCAACCAACACCACGTTGACGAAAGCCAACAGCTACAACGTCGATCTTT
CGAATAGCACCGGTACACTTGAATTTGAACTGGTGTATGCCGTCAATACCACCCA
AACGATCTCGAAGTCGGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTTAAAGGCCTGGAA
GACCCCGAGGAGTACCTCAGAATGGGTTTCGAGGTTTCTGCGTCCTCCTTCTTCCT
TGATCGCGGGAACAGCAAAGTAAAATTTGTTAAGGAGAACCCATATTTTACCAA
CAGGATGAGCGTTAACAACCAACCATTCAAGAGCGAAAACGACCTGTCGTACTA
CAAAGTGTATGGTTTGCTTGATCAAAATATCCTGGAACTCTACTTCAACGATGGT
GATGTCGTGTCCACCAACACATACTTCATGACAACCGGGAACGCACTGGGCTCCG
TGAACATGACGACGGGTGTGGATAACCTGTTCTACATCGACAAATTCCAGGTGA
GGGAAGTCAAGTGAgatctgtcgatcgacaagctcgagtttctccataataatgtgtgagtagttcccagataagggaatta
gggttcctatagggtttcgctcatgtgttgagcatataagaaacccttagtatgtatttgtatttgtaaaatacttctatcaataaaatttctaatt
cctaaaaccaaaatccagtactaaaatccagatcccccgaattaa

REIVINDICACIONES SOLICITUD
DIVISIONAL No. 09.149.183

1. Un método para producir un lípido, que comprende:

(a) Cultivar una población de microalgas bajo condiciones heterotróficas en un medio de cultivo que comprende material celulósico despolimerizado como una fuente de carbón primario hasta que las microalgas acumulen 60% o más de su peso de células secas como lípido; y

(b) Separar el lípido de las microalgas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el material celulósico despolimerizado comprende xilosa.

3. El método de la reivindicación 2, en donde las microalgas están caracterizadas por un nivel mayor de producción de lípidos en la etapa de cultivar que cuando se cultivan en solo glucosa.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el material celulósico despolimerizado comprende glucosa y xilosa.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo es agénico.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el material celulósico despolimerizado es uno o más materiales seleccionados del grupo que consiste de bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, rastrojo de maíz, paja de

trigo, paja de arroz, pulpa de remolacha de azúcar, pulpa de cítricos, cáscaras de cítricos, clareos de madera, clareos de coníferas, virutas de madera, aserrín, desechos de molienda de pulpa, desechos de papel urbano, recortes de césped, pasto varilla, madera de álamo híbrido, miscanto, fibra de caña, y fibra de sorgo.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el material celulósico despolimerizado es bagazo de caña.

8. El método de la reivindicación 6, en donde el material celulósico despolimerizado es fibra de maíz.

9. El método de la reivindicación 6, en donde el material celulósico despolimerizado es miscanto.

10. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas son cultivadas bajo condiciones limitadas de nitrógeno.

11. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido comprende 50% o más de C18:1.

12. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido comprende 3% o más de C18:0 y 8% o más de C16:0.

13. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas acumulan 65% o más de su peso de células secas como lípido.

14. El método de la reivindicación 13, en donde las microalgas acumulan 70% o más de su peso de células secas como lípido.

15. El método de la reivindicación 1, en donde separar el lípido de las microalgas comprende lisar las microalgas y recuperar el lípido usando un solvente orgánico.

16. El método de la reivindicación 15, en donde el solvente orgánico es hexano.

17. El método de la reivindicación 1, que comprende además tratar el material celulósico con una enzima produciendo así el material celulósico despolimerizado del medio de cultivo.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde las microalgas se seleccionan del grupo que consiste de *Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Bracteococcus minor, Bracteococcus medionucleatus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora (cepa SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis,*

Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella ovalis, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (incluyendo cualquiera de las cepas UTEX 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta, Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEX LB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp.,

Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, Parachlorella kessleri, Pascheria acidophila, Pavlova sp., Phagus, Phormidium, Platymonas sp., Pleurochrysis carterae, Pleurochrysis dentate, Pleurochrysis sp., Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis, Prototheca zopfii, Pseudochlorella aquatica, Pyramimonas sp., Pyrobotrys, Rhodococcus opacus, Sarcinoid chrysophyte, Scenedesmus armatus, Schizochytrium, Spirogyra, Spirulina platensis, Stichococcus sp., Synechococcus sp., Tetraedron, Tetraselmis sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii, y *Viridiella fridericiana*.

19. El método de la reivindicación 18, en donde las microalgas son del gen *Chlorella* o *Prototheca*.

20. El método de la reivindicación 19, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides.*

21. El método de la reivindicación 19, en donde las microalgas son *prototheca moriformis.*

22. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de cultivar se lleva a cabo en la ausencia de luz.

23. El método de la reivindicación 1, en donde las microalgas son heterótrofas obligadas.

24. Un lípido producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona métodos y composiciones útiles para la producción de aceites, combustibles, oleoquímicos y otros compuestos en microorganismos. En particular, la invención proporciona microorganismos portadores de aceite y métodos de cultivo a bajo costo de tales microorganismos. La invención también proporciona células microbianas que contienen genes exógenos que codifican, por ejemplo una lipasa, transportador de sacarosa, sacarosa invertasa, fructocinasa, una enzima polisacárido-degradante, acil-ACP tioesterasa grasa, acil-CoA/aldehído reductasa grasa, acil-CoA reductasa grasa, aldehído reductasa grasa, aldehído descarbonilasa grasa y/o una proteína portadora de acilo. La invención también incluye métodos para la manufactura de combustible de transportación tales como diesel renovable, biodiesel y combustible de jet renovable.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Jeffrey W. Bullock*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

5. *at Dover, Delaware*

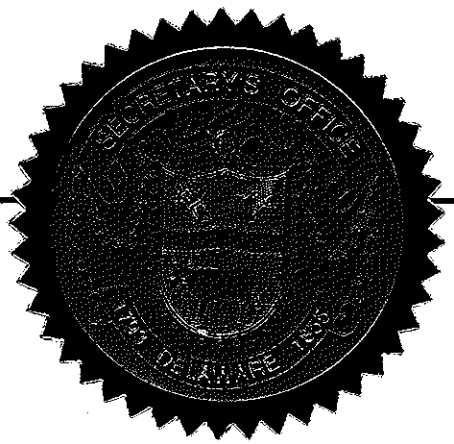
6. *the twenty-fifth day of March, A.D. 2010*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0410473*

9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature:*



Secretary of State

Delaware

The First State

I, JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "SOLAZYME, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE EIGHTEENTH DAY OF MARCH, A.D. 2010.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "SOLAZYME, INC." WAS INCORPORATED ON THE THIRTY-FIRST DAY OF MARCH, A.D. 2003.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.



Jeffrey W. Bullock, Secretary of State

3635550 8300

AUTHENTICATION: 7879430

100295413

DATE: 03-18-10

You may verify this certificate online at corp.delaware.gov/authver.shtml

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by M.K. Carter

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the fifth of February, 2010

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 10013788-10

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Patrick O. Hatchett

A 1785500

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

January 25, 2010

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON JANUARY 13, 2010.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

M. K. CARTER
Certifying Officer

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
DEPARTMENT OF COMMERCE

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

01/13/2010
501064014

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Harrison F. Dillon	06/27/2008
Anthony G. Day	06/30/2008
Donald E. Trimbur	07/03/2008
Chung-Soon Im	06/30/2008
Anna Coragliotti	07/01/2008
Scott Franklin	06/30/2008

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Solazyme, Inc.
Street Address:	561 Eccles Avenue
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
PCT Number:	US0865563

US0865563
CH $40.00

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (415)576-0300
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650-326-2400
Email: mrcatiis@townsend.com
Correspondent Name: Lance Termes
Address Line 1: TOWNSEND and TOWNSEND and CREW LLP
Address Line 2: Two Embarcadero Center, 8th Floor
Address Line 4: San Francisco, CALIFORNIA 94111-3834

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	026172-002430PC

NAME OF SUBMITTER:	Lance Termes

Total Attachments: 2
source=Solazyme#page1.tif
source=Solazyme#page2.tif

Attorney Docket No.: 026172-002430PC

ASSIGNMENT OF PATENT APPLICATION

JOINT

WHEREAS, Harrison F. Dillon of South San Francisco, CA 94080; Anthony G. Day of South San Francisco, CA 94080; Donald E. Trimbur of South San Francisco, CA 94080; Chung-Soon Im of South San Francisco, CA 94080, Anna Coragliotti of South San Francisco, CA 94080, and Scott Franklin of South San Francisco, CA 94080, hereinafter referred to as "ASSIGNORS," are the inventors of the invention described and set forth in the below-identified application:

Title of Invention: PRODUCTION OF OIL IN MICROORGANISMS

Filing Date: June 02, 2008

Application No.: PCT/US08/65563

WHEREAS, Solazyme, Inc., a Delaware corporation, located at 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080, hereinafter referred to as "ASSIGNEE," is desirous of acquiring ASSIGNORS' interest in the invention and application and in any Patent and/or Registration which may be granted on the same;

NOW THEREFORE, for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged by ASSIGNORS, ASSIGNORS have assigned, and by these presents do assign to ASSIGNEE and ASSIGNEE'S successors and assigns, all their right, title and interest in and to the invention and application, and in and to any Patent and/or Registration which may hereafter be granted on or claiming priority from the same in the United States or other country in the world, the right, title and interest to be held and enjoyed by ASSIGNEE and ASSIGNEE'S successors and assigns as fully and exclusively as it would have been held and enjoyed by ASSIGNORS had this Assignment not been made, for the full term of any Letters Patent and Registrations which may be granted thereon, or of any division, renewal, continuation in whole or in part, substitution, conversion, reissue, prolongation or extension thereof.

ASSIGNORS further agree that they will, without charge to ASSIGNEE, but at ASSIGNEE'S expense, (a) cooperate with ASSIGNEE in the prosecution of the application and/or any applications on the invention, including foreign counterparts, (b) execute, verify, acknowledge and deliver all such further papers, including patent applications and instruments of transfer, and (c) perform such other acts as ASSIGNEE lawfully may request to obtain or maintain Letters Patent and/or Registrations for the invention and improvements in any and all countries, and to vest title thereto in ASSIGNEE, or ASSIGNEE'S successors and assigns.

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignors have signed their names on the dates indicated.

Dated: 6/27/08 — Harrison F. Dillon

Dated: 6/30/08 — Anthony G. Day

Dated: 7/3/08 — Donald E. Trimbur

Dated: 6/30/08 — Chung-Soon Im

Dated: 7/1/08 — Anna Coragliotti

Dated: 6/30/08 — Scott Franklin

BAKER & McKENZIE

Baker & McKenzie Colombia S.A.
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 900.034.906-9
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakernet.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

Solazyme, Inc.

located at

561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080

declares that it hereby grants to

ÁLVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
RICARDO METKE MENDEZ and/or
JUAN PABLO CONCHA-DELGADO and/or
OLGA GEORGETTE OTERO

of the firm Baker & McKenzie Colombia S.A. members of Baker & McKenzie, domiciled at Av. 82 No. 10-62, 6th floor, of Bogotá D.C., Colombia, full and sufficient power of attorney to pursue before the competent authorities the following matters:

Trademark registrations and renewals; deposit and registration of commercial names and commercial ensigns; registration and renewal of domain names; obtainment of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits layout-designs and vegetal varieties; recordals of mergers, changes of name, assignments, changes of domicile and address; security interests; recordal of license of use agreements, liens and other acts that affect or limit the mentioned industrial property rights; filing and prosecution of all matters relating to domain names; filing and prosecution of oppositions, cancellation actions, annulment actions, annulment and reinstatement of right action, precautionary injunctions, infringement actions, and all administrative and judicial actions available for the prosecution of proceedings related to industrial property matters, unfair competition and protection of consumers,

to which end it empowers them to file requests, petitions and lawsuits, appeals and objections, pay taxes, receive, including faculties to enter into settlement agreements, conciliations and transactions, abandon applications and renounce to intellectual property rights and, in general, to take all the actions before the competent authorities in order to duly protect our intellectual property. To the said mandatories sufficient power is granted hereby to receive notifications for and on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the Company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the intellectual property rights, and to do everything that may be required before administrative or judicial officers of any class to comply this power, giving them likewise faculty to substitute these presents and revoke such substitutions if necessary.

Done and subscribed in South San Francisco, California

On the 1st day of Feb. of 20 10

Signature of the person Issuing the Power

PODER

La abajo firmada,

Solazyme, Inc.

domiciliada en

561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080

declara por el presente que otorga a

ÁLVARO CORREA-ORDÓÑEZ y/o
RICARDO METKE MÉNDEZ y/o
JUAN PABLO CONCHA-DELGADO y/o
OLGA GEORGETTE OTERO

de la firma Baker & McKenzie Colombia S.A. miembros de Baker & McKenzie, domiciliada en la Av. 82 No. 10-62 Piso 6 en Bogotá D.C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para adelantar ante las autoridades competentes los siguientes asuntos:

Registro y renovación de marcas; depósito y registro de nombres comerciales y enseñas comerciales; registro y renovación de nombres de dominio; obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; inscripción de fusiones, cambios de nombre, traspasos, cambios de domicilio y de dirección; inscripción de contratos de prenda, inscripción de licencias de uso, embargos y otros actos que afecten o limiten los mencionados derechos de propiedad industrial; presentación y tramitación de todos los asuntos relacionados con nombres de dominio; presentación y tramitación de oposiciones, acciones de cancelación, acciones de nulidad, acciones de nulidad y restablecimiento del derecho, medidas cautelares, acciones por infracción de derechos, y demás acciones judiciales, relacionadas con procesos de propiedad industrial, competencia desleal y protección del consumidor,

A cuyo efecto los faculta para presentar solicitudes, peticiones y demandas, interponer recursos, reclamos, pagar impuestos y tasas, recibir, transigir y desistir, incluyendo facultades para entrar en acuerdos amigables, conciliaciones y transacciones, abandonar solicitudes y renunciar a derechos de propiedad industrial, y en general, a dar ante las autoridades competentes todos los pasos necesarios para la debida protección de nuestra propiedad industrial. Asimismo se concede a los expresados mandatarios poder suficiente para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de los derechos de propiedad industrial se presentaren y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden para el cumplimiento de este mandato, dándoles igualmente facultad para sustituir el presente poder y en caso necesario, revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado en South San Francisco, California

A los 1st días del mes de Feb. de 20 10

Firma de la persona que firma el Poder

EXECUTION IN THE PRESENCE OF A NOTARY IS REQUIRED

State of California

SECRETARY OF STATE

Requested for use in Colombia.
Not for use within the United States of America.
The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document has acted, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by L. S. Mcintosh*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of L. S. Mcintosh, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 8th day of February 2010*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 778920*
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature*

Debra Bowen
Secretary of State



BY _____

ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo)

On February 1, 2010 before me, L.S. McIntosh
(insert name and title of the officer)

personally appeared Harrison Dillon,
who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

L. S. MCINTOSH
COMM. # 1867263
NOTARY PUBLIC-CALIFORNIA
ALAMEDA COUNTY
MY COMM. EXP. JULY 24, 2012

Signature _____ (Seal)

Traducción oficial de inglés por Marlén Neira C. resolución 2117 de Ministerio Justicia de Colombia

APOSTILLA EN CESIÓN A SOLAZYME, INC.

APOSTILLE

(Convención de La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por M.K. Carter
3. Quien ejerce funciones de oficial de certificación
4. Lleva el sello de Oficina de marcas y patentes U.S.

CERTIFICADO

5. En Washington, D.C.
6. El 5 de febrero de 2010.
7. Por el oficial de autenticación asistente, departamento de estado de los Estados Unidos
8. No. 10013788-10
9. Gran Sello del estado
10. Firma ilegible del Patrick O.. Hatchett

Estados Unidos de América. –

A todos a quienes vieren el presente,

Departamento de Comercio de Los Estados Unidos

Oficina de marcas registradas y patentes de los Estados Unidos

25 de enero de 2010

Por el presente certifico que anexo se encuentra una copia verdadera de los registros de esta oficina de un documento registrado el 13 de enero de 2010.

Por autoridad de Sub-secretario de Comercio para la Propiedad intelectual

Y Director de la Oficina de marcas registradas y patentes de los Estados Unidos.

Firma y nombre de M. K. Carter oficial certificador

A mano:

Departamento de comercio- Estados Unidos Oficina de marcas y patentes

CESION DE PATENTE

Versión electrónica v1.1 01/ 13/ 2010.

Versión Stylesheet v1.1 501064014

Tipo de presentación	Cesión nueva
Naturaleza de la cesión	Traspaso

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

Datos de la parte cedente

Nombre	Fecha de suscripción 3/3
Harrison F. Milton	06 / 27/ 2008
Anthony G. Day	08 / 30 /2008
Donald E. Trimbur	07 / 03/ 2008
Chung- Soon Im	06 / 30 / 2008
Anna Coraglioti	07 / 01 / 2008
Scott Franklin	06 / 30 / 2008

DATOS DE LA PARTE RECEPTORA	
Nombre	Solazyme, Inc.
Dirección	561 Eccles Avenue
Ciudad	South San Francisco
Estado/ país	California
Código postal	94080

Números de propiedad Total: 1	
Tipo propiedad	Número
Número PCT	US0865563

DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Fax	415- 576-0300
Se enviará correspondencia por el correo US cuando el intento de enviar fax fracaso	
Teléfono	650-326- 2400
Dirección electrónica	mrcatiis@townsend.com
Nombre de correspondencia	Lance Termes
Línea 1 de dirección	Townsend and Townsend and Crew LLP
Línea 2 de dirección	Two Embarcadero Center, 8th Floor
Línea 4 de dirección	San Francisco, California 94111-3834
Número de casillero abogado	026172- 002430PC
Nombre del solicitante	Lance Termes

No. Anexos: 2	Rollo: 023772 Marco: 0307
Fuente- Solazyme# pagina1.rtf	
Fuente- Solazyme# pagina2.rtf	Rollo: 023772 Marco: 0308

Casilla de abogado NO. 026172-002430PC

CESION DE SOLICITUD DE PATENTES Conjunta

Por cuanto, Harrison F. Dillon de South San Francisco CA 94080; Anthony G. Day de South San Francisco, CA 94080; Donald E. Trimbur de South San Francisco, CA, 94080; Chung-Soon Im de South San Francisco, CA 94080, Anna Coragliotti de South San Franciso, CA 94080, y Scott Franklin de South San Francisco, CA 94080m en adelante referidos como

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

"Cedentes" son los inventores de la invención descrita y establecida en la solicitud identificada a continuación: 3/3

Título de la invención: PRODUCCION DE ACEITE EN MICROORGANISMOS

Fecha de presentación: 2 de junio de 2008

Solicitud No. PCT/ US08 / 65563

Por cuanto, Solazyme, Inc, una compañía de Delaware, localizada en el 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080, en adelante referida como la "Cesionaria", tiene la intención de adquirir el interés de los Cedentes en la invención y en la solicitud de patente y/o registro que pueda otorgarse a la misma;

Por lo tanto, por una contraprestación buena y valiosa, cuyo recibo se reconoce por el presente, los Cesionarios han cedido, y por el presente ceden a la Cesionaria y a los sucesores y cesionarios de la Cesionaria, todos sus derechos, títulos e interés en y sobre la invención y solicitud, y en la patente y/ o registro que pueda otorgarse en adelante o sobre la que pueda reclamarse prioridad de la misma en los Estados Unidos o en otro país del mundo; tal derecho, título e interés lo tendrá y disfrutará la Cesionaria y los sucesores y cesionarios de la Cesionaria tan total y exclusivamente como si lo tuvieran y disfrutaran los Cedentes si no se hubiera hecho tal cesión, por todo el término de la Patente y Registro que puedan otorgarse a la misma, o una división, renovación, continuación total o parcial, sustitución, conversión, re-expedición, prolongación o extensión de la misma invención.

Los Cedentes acuerdan además que, sin cargo para la Cesionaria, sino a expensas de la Cesionaria, ellos (a) cooperarán con la Cesionario en la persecución de la solicitud, y/ o de alguna solicitud de la invención, incluyendo contrapartes extranjeras, (b) suscribiendo, verificando, reconociendo y entregando todos los demás papeles, que incluyen solicitudes de patentes e instrumentos de transferencia, y (c) realizando cualquier otro acto que la Cesionaria solicite legalmente para obtener o mantener Patentes y/ o Registros para la invención y mejoras en todos y cada uno de los países, y para investir el título de ella en la Cesionaria, o en los sucesores y cesionarios de al Cesionaria.

Rollo: 023772 Marco: 0309

Cesión
Casillero de abogado No. 026172- 002430PC
Solicitudes PCT NO. PCT/ US 08 / 65563
Página 2

En testimonio de lo anterior, hemos firmado en las fechas indicadas a continuación.

Fechado : 6- 27- 08	Harrison F. Dillon
Fechado el 6- 30- 08	Anthony G. Day
Fechado el: 7- 3- 08	Donald E. Trimbur
Fechado el 6- 30- 08	Chung Soon Im
Fechado :el 7- 1- 08	Anna Coragliotti
Fechado el 6- 30- 08	Scott Franklin

Registrado el 01 / 03 / 2010 Rollo: 023772 Marco: 0301

Es traducción conforme con copia en archivo de traductora, Bogotá, Febrero 24- 2010.

Helu Neira C

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987