

Doctor

José Luis Salazar

Director de Nuevas Creaciones (C)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183-00009-0000
Fecha: 2013-07-12 16:13:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 37

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
DEL 16 DE ABRIL DE 2013, OFICIO NO. 6787 (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. Objeciones del Examinador

1.1 Presentación de solicitudes Fraccionarias

Su Despacho establece que no se acepta para examen la solicitud fraccionaria presentada e identificada como 09149183A, porque implica la creación de una solicitud sin la debida falta de unidad de invención ya que el concepto común "Producción de lípidos con microalgas a partir de residuos celulósicos depolimerizados" se encuentra presente tanto en el capítulo reivindicatorio de la solicitud original y de la solicitud divisional".

1.2 Claridad de las reivindicaciones

El examinador establece que las reivindicaciones 1, 9, 10, 12, 14, 18 y 30 no son concisas porque la lista de especies de microalgas, genes exógenos de sacarosa invertasa, sacarosa invertasa exógena, nitrógeno limitado y someter a una o más reacciones químicas para generar ésteres de ácidos grasos, es amplia y/o hace referencia a géneros funcionales o condiciones de reacción muy amplias; se sugiere restringir a una razonable generalización del tipo de microorganismos, genes específicos, condiciones de reacción y/o compuestos químicos que han sido probados, es decir, que se encuentran debidamente sustentados. Para el caso de los genes indicar la identificación de la secuencia (ID) tanto de ADN como de proteínas.

Por otro lado, el examinador menciona que la reivindicación 20 no es clara porque el término "gen" presenta un error de digitación. El examinador sugiere que se realice la corrección por el término género.

1.3 Nivel inventivo

Su Despacho establece que los documentos **D1**¹ (Artículo 1) y **D3**² (US2006/0130182) afectan el nivel inventivo de la presente invención, en forma resumida argumenta lo siguiente:

Con relación a la reivindicación 1:

"Los documentos D1 y D3 se consideran el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1, porque divulgan métodos para modificar el metabolismo de algas y la producción de lípidos. La diferencia entre la invención definida en la reivindicación 1 y el método de D1 consiste en que D1 no menciona la enzima sacarosa invertasa exógena.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el método del documento D3 consiste en que en D3 no se menciona la producción de lípidos a partir de medios de cultivo que contienen sacarosa (...). Sin embargo, el uso de genes exógenos para regular el metabolismo de carbohidratos ya está divulgado en

¹ "Biodiesel from microalgae"

² "Expression cassette for nucleic acids in plant tissue containing starch"

D3 que se refiere a un método de modificación genética de plantas, entre ellas algas. En consecuencia, una persona normalmente versada en la materia incluiría los genes de D3 en el procedimiento de D1, esperando con certeza lograr el método, como el de la reivindicación 1(...). Las reivindicaciones 1 a 17 cumplen con el requisito de novedad, pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo."

Con relación a la reivindicación 18:

"La diferencia entre la reivindicación 18 de la solicitud en estudio y el método de D1 consiste en que D1 no menciona la enzima sacarosa invertasa exógena. La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 18 y el método de D3 consiste en que en D3 no se menciona la producción de lípidos a partir de medios de cultivo que contienen sacarosa.

El efecto que logra el incluir la presencia de genes exógenos como el de la sacarosa invertasa es que permite metabolizar los carbohidratos como la sacarosa de un medio de cultivo de forma más eficiente (...)

Sin embargo, el uso de genes exógenos para regular el metabolismo de carbohidratos ya está divulgado en el documento D3 que se refiere a un método de modificación genética de plantas, entre ellas algas (Pag. 18. Párrafo. 226, Parr. 230, Página 16, Párr.191 y Párr. 193)

En consecuencia, una persona normalmente versada en la materia incluiría los genes de D3 en el procedimiento de la anterioridad D1, esperando con certeza lograr el método, como la de la reivindicación 1 de la solicitud, lo cual es considerado obvio.

Concluye su Despacho que las reivindicaciones 18 a 30 cumplen con el requisito de novedad pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo.

2. Respuesta a las observaciones del Examinador

2.1 Solicitud Divisional

Su Despacho no acepta la solicitud divisional presentada porque el examinador no objetó la

unidad de invención durante el examen de fondo.

Al respecto estamos en total desacuerdo con su Despacho ya que se le está dando una interpretación errónea al artículo 36 de la Decisión 486.

El artículo 36 de la Decisión 486 establece textualmente lo siguiente:

Artículo 36 "El solicitante podrá, en cualquier momento del trámite, dividir su solicitud en dos o más fraccionarias, pero ninguna de éstas podrá implicar una ampliación de la protección que corresponda a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

La oficina nacional competente podrá, en cualquier momento del trámite, requerir al solicitante que divida la solicitud si ella no cumpliera con el requisito de unidad de invención.

Cada solicitud fraccionaria se beneficiará de la fecha de presentación y, en su caso, de la fecha de prioridad de la solicitud inicial.

En caso de haberse invocado prioridades múltiples o parciales, el solicitante o la oficina nacional competente, indicará la fecha o fechas de prioridad que corresponda a las materias que deberán quedar cubiertas por cada una de las solicitudes fraccionarias.

A efectos de la división de una solicitud, el solicitante consignará los documentos que fuesen necesarios para formar las solicitudes fraccionarias correspondientes".

En ninguna parte de dicho artículo se establece que no se aceptará divisionales si la Oficina de Patentes no objeta la unidad de invención.

El artículo 36 establece claramente que el solicitante en cualquier momento del trámite podrá presentar una solicitud divisional y menciona como única condición que no se debe presentar ampliación de la materia originalmente presentada.

El segundo párrafo del artículo 36 simplemente es otra posibilidad de presentar divisionales y es cuando la Oficina de Patentes requiere al solicitante que divida su solicitud por que considera en el momento de efectuarse el estudio de patentabilidad, que no se cumple con el requisito de unidad de invención.

En ninguna parte del mencionado artículo establece como única condición para aceptar una divisional de que su Despacho considere falta de unidad de invención. Tanto así, que el artículo 36 cita la frase "en cualquier momento del trámite", es decir puede radicarse divisionales antes de que se efectúe el examen de fondo o después de dar la respuesta al artículo 45.

Mal hace su Despacho al negar el derecho que tiene mi representada de presentar divisionales sin presentar ningún fundamento jurídico.

En conexión con lo anterior, traigo a colación lo establecido por la Guía para examen de solicitudes de patente de invención y modelos de utilidad expedida por la Superintendencia de Industria y Comercio en Mayo de 2012, en el numeral 2.1.8 páginas 51-53 con respecto a las solicitudes divisionales:

"2.1.8 Divisionales (solicitudes fraccionarias)

Al igual que en el caso de las modificaciones, el examinador deberá verificar si se presentaron solicitudes fraccionarias. En caso afirmativo, deberá asegurarse que ninguna de las fraccionarias implique una ampliación de la protección que corresponda a la divulgación contenida en la solicitud parental.

Asimismo y en caso de haberse invocado prioridades múltiples o parciales, deberá verificar que el solicitante, haya indicado la fecha o fechas de prioridad que correspondan a las materias que deberán quedar cubiertas por cada una de las solicitudes fraccionarias.

Si las fraccionarias presentadas implican ampliación de la materia contenida en la solicitud parental y, por lo tanto, no pueden aceptarse para examen, el examinador debe indicar concretamente cuáles son los elementos que amplían la materia.

Debe analizar las solicitudes fraccionarias junto con la solicitud parental para identificar si después de la división se mantiene materia superpuesta. Si las solicitudes fraccionarias no están bien presentadas porque hay materia que está reivindicada en más de una de ellas (materia superpuesta) se aceptarán todas para examen; sin embargo en el examen de cada una de las fraccionarias se requerirá la corrección del error, es decir, que se retire esa materia de una de ellas y se deje sólo en la otra. Esto quiere decir que el estudio de cada una las fraccionarias deberá efectuarse de manera simultánea.

- Las divisionales pueden ser sugeridas por la SIC en el primer requerimiento de que trata el Art 45 de la D. 486. Si así se hace, y el solicitante no procede a dividir la solicitud pero

presenta su opinión a favor de la unidad de invención, pero la SIC se mantiene en su posición inicial, se dará una oportunidad para subsanar la falta de unidad de invención.

- Si no se cumple con lo solicitado en el segundo requerimiento, el examinador deberá proceder a decidir la solicitud de patente.

- El solicitante podrá dividir nuevamente una solicitud fraccionaria siempre y cuando no amplíe la materia presentada en la solicitud fraccionaria que le dio origen. La materia de la solicitud original que no esté presente en alguna de las solicitudes fraccionarias presentadas con motivo de la primera división se considerará retirada.

- El solicitante podrá fraccionar la solicitud y presentar la solicitud de conversión de modalidad.

Además, el examinador deberá colaborar en la gestión documental de las solicitudes fraccionarias y de la solicitud parental de la siguiente manera:

- Verificar la presentación del "Formulario Único de Conversión, División y Fusión de Solicitudes" (PI02-F05) en cada solicitud fraccionaria.

- Si es necesario, deberá reorganizar en orden cronológico las diferentes actuaciones de la solicitud parental y de cada una de las solicitudes fraccionarias.

- Verificar que cada solicitud fraccionaria contenga los siguientes documentos: el petitorio de la solicitud parental y que esté visible la fecha de presentación, la descripción, las reivindicaciones respectivas a la fracción, los dibujos si los hay, el resumen, los poderes, el comprobante de pago de la tasa, de ser el caso: la copia del contrato de acceso, la copia de la licencia o autorización del uso de conocimientos tradicionales, el certificado de depósito de material biológico, la copia del documento en el que conste la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causahabiente. Debe entenderse que éstos pueden ser copias simples de los presentados en la solicitud parental.

- El examinador deberá constatar que las solicitudes fraccionarias invoquen las prioridades respectivas, no siendo necesaria una nueva presentación de la solicitud prioritaria.

- Numerar todos los folios de manera consecutiva incluyendo la actuación que el examinador efectúe sobre el expediente.

- El examinador deberá verificar que el solicitante haya pagado la tasa de presentación correspondiente a cada solicitud fraccionaria y los documentos que fuesen necesarios para formar las solicitudes (Art 26 y 36 D 486)"

De lo anterior es claro, que la Guía expedida por su Despacho está en concordancia con lo establecido en el artículo 36 de la Decisión 486, es decir, el examinador deberá asegurarse si la divisional no amplía la materia de la invención originalmente presentada y revisará si hay superposición de materia.

No menciona en ninguna parte el rechazo de divisionales por no haberse presentado observaciones de unidad de invención.

Por otro lado, mi representada cumplió con todos los requisitos legales y formales que se exige para la presentación de las divisionales que son:

- Se presentó durante el trámite.
- No se presenta ampliación de la invención inicialmente presentada
- Se presenta el formulario único de solicitud divisional
- Se presentó el recibo de pago por presentación de solicitud divisional
- Se presentó el texto y las reivindicaciones de la divisional etc.

Por lo tanto, al no encontrarse sustento jurídico, no es correcto que su Despacho no haya aceptado la divisional presentada por mi representada el 1 de Marzo de 2013.

En consecuencia, respetuosamente solicito a su Despacho se pronuncie sobre los **fundamentos legales** para la no aceptación de la divisional.

2.2 Claridad de la solicitud

Con el objeto de atender a las observaciones de su Despacho en cuanto a la falta de claridad de las reivindicaciones 1, 9, 10, 12, 14, 18 y 30 porque se considera como amplia la lista de microalgas, los genes exógenos de sacarosa invertasa, sacarosa invertasa, nitrógeno limitado y las reacciones químicas no se limitan a un razonable generalización de los tipos que han sido probados y los genes invertasa no se identifican mediante las SEQ ID No. Al respecto informamos a su Despacho que presento un nuevo capítulo reivindicatorio en el cual se cancelaron las reivindicaciones 9 y 10. Se modificaron las reivindicaciones 1, 14-16, 18, 20, 21, 25 y 27-29. Los métodos de las reivindicaciones 1 y 18 se modificaron de tal forma que mencionan un cultivo heterotrófico y la selección de microalgas de *Chlorella* o *Prototheca*, el sustento de estas modificaciones pueden encontrarse en la descripción párrafos 0052 y 0178 de la publicación de la solicitud internacional (WO2008/151149) que corresponde a la presente solicitud.

La reivindicación 25 se modificó de manera similar en donde se menciona que la selección

de microalgas es de *Chlorella* o *Prototheca*, el sustento se encuentra en el párrafo 0052.

Las reivindicaciones 14-16, 20, 21 y 27-29 se modificaron de tal forma que se menciona las microalgas mostradas en los ejemplos de la declaración adjunta que mostraron haber sido exitosamente transformada con una sacarosa invertasa exógena. Es decir, las reivindicaciones 14 y 27 mencionan *Chlorella emersonii*, *Chlorella minutissima*, y *Chlorella protothecoides*.

La reivindicación 16 se modificó de tal forma que se mencionan reacciones químicas particulares, ver por ejemplo, párrafos 0329, 0339, 0340, 0341, 0352, 0364, 0365, y 0367.

Aunque el solicitante ha modificado las reivindicaciones, por favor note que estas modificaciones no deben considerarse como consentimiento a cualquier posición tomada por el examinador con respecto a las reivindicaciones anteriormente presentadas. Por el contrario, el solicitante ha modificado las reivindicaciones con el fin de definir más específicamente la invención reivindicada y agilizar el trámite de la solicitud.

Así mismo, se presentan las siguientes aclaraciones:

2.2.1 Microalgas

Sin estar de acuerdo con la objeción, el solicitante ha corregido las reivindicaciones independientes 1 y 18 para citar las microalgas del género *Chlorella* o *Prototheca*.

La transformación exitosa de microalgas de estos géneros con una sacarosa invertasa exógena se muestra en los ejemplos de la solicitud y en la declaración anexa del Dr. Peter Licari, que se discute con gran detalle adelante con relación al nivel inventivo de la materia objeto reivindicada. El solicitante considera que en vista de la transformación ejemplificada tanto de las especies *Chlorella* como *Prototheca*, así como también la guía dada en la descripción con relación a ingeniería genética, las microalgas reivindicadas representan una generalización razonable del tipo de microorganismos mostrados como útiles en la presente invención.

De manera similar, la reivindicación independiente 25 se ha modificado para citar una

célula de microalga del género *Chorella* o *Prototheca*. De esta forma, cualquier objeción a la reivindicación 30 fundamentada en la concisión de las microalgas se soluciona mediante las modificaciones a las reivindicaciones 25 y 27-29.

2.2.2 Genes invertasa:

El solicitante considera que la mención de la sacarosa invertasa es una generalización razonable del tipo de gen mostrado por haber sido exitosamente transformado en las microalgas de la presente invención reivindicada. Como se anotó en la descripción, varias sacarosas invertasas son adecuadas para el uso en relación con la invención reivindicada (Ver párrafo 0232, que identifica las invertasas mediante los números de acceso del GenBan) y se puede modificar para optimizar el uso del codón para células de microalgas particulares (párrafo 0234).

En vista de las enseñanzas del solicitante en la descripción, y la transformación ejemplificada de las células de microalga con una sacarosa invertasa, la persona medianamente versada sería capaz de utilizar una cualquiera de un número de sacarosas invertasas para llevar a la práctica la invención reivindicada.

Por lo tanto, pedirle al solicitante que limite la materia objeto reivindicada a una sacarosa invertasa específica identificada mediante su secuencia es innecesariamente limitante.

2.2.3 Reacciones Químicas:

Sin estar de acuerdo con la objeción el solicitante ha corregido la reivindicación 18 para citar reacciones químicas específicas discutidas en la descripción. Cada una de estas reacciones sería familiar para la persona medianamente versada y el uso de tales reacciones químicas en relación con los lípidos de microalgas de la invención actualmente reivindicada sería fácilmente entendido en referencia con la descripción. De esta forma, el solicitante considera que estas reacciones químicas están completamente soportadas por la descripción, y no existe razón para dudar de que ellas se pudieran utilizar en relación con los lípidos de microalgas para generar ésteres de ácidos grasos y/o alcanos, tal como se reivindica.

2.2.4 Otras reivindicaciones:

Sin estar de acuerdo con su Despacho las reivindicaciones 9, 10 y 12 se cancelaron para facilitar el trámite de la solicitud.

Teniendo en cuenta las anteriores modificaciones y explicaciones se tiene que el nuevo pliego reivindicatorio cumple a cabalidad con el artículo 30 de la Decisión 486.

2.3. Novedad

El examinador reconoce la novedad de la solicitud en estudio, por lo tanto, el requisito a sustentar es el nivel inventivo.

2.4 Nivel inventivo

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 por los documentos D1 y D3.

Se alega que a la materia objeto reivindicada le falta nivel inventivo en vista de los documentos Y. Chisti, *Biotechnology Advances*, 25:294-306, 2007 (D1) y US 2006/0130182 de Heim et al (D3). En particular, se dice que D1 describe la producción de lípidos provenientes de microalgas y la transesterificación para producir biodisel y se dice que D3 describe la transformación de algas con genes que incluyen aquellos para modificar la expresión y la actividad de la invertasa. De esta manera, su Despacho concluye que una persona medianamente versada incluiría los genes de D3 en el proceso de D1, esperando con certeza obtener los métodos reivindicados.

Respetuosamente, mi representada no está de acuerdo. Los documentos mencionados no enseñan el cultivo heterotrófico o la transformación de células de microalgas con una

sacarosa invertasa, ni la persona medianamente versada podría haber predicho el éxito sobre la base de la citada técnica anterior en vista de la naturaleza no predecible de la ingeniería genética en organismos no bien caracterizados tales como aquellos de la invención actualmente reivindicada. Más aún la persona medianamente versada no habría podido predecir los rendimientos mejorados de los lípidos logrados con las microalgas reivindicadas cuando crecen sobre sacarosa, particularmente jugo de caña tal como se discute en la declaración del Dr. Licari. Por al menos estas razones, la invención actualmente reivindicada posee nivel inventivo sobre el arte previo citado.

La técnica anterior no enseña la transformación de microalgas con una sacarosa invertasa

El arte previo no enseña el cultivo heterotrófico de microalgas o la transformación de células de microalgas con un gen de sacarosa invertasa exógeno, tal como se reivindicó. Tal como lo anota su Despacho D1 no menciona la expresión de una sacarosa invertasa exógena, y D3 que se cita para discusión de los genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos no aporta ninguna enseñanza relevante ni ninguna referencia con relación a la transformación de las microalgas con un gen de sacarosa invertasa.

Los pasajes del documento D3 citados por su Despacho (página 18, párrafos 226 y 230) solo se refieren a un inhibidor de la invertasa o análogos funcionales del mismo. No se hace referencia a la sacarosa invertasa. En su lugar, D3 se dirige a la expresión transgénica de ácidos nucleicos en almidón que comprende tejidos de plantas, y ejemplifica la transformación de plantas de papa y tomate con un promotor de la sintasa de almidón soluble proveniente de las plantas de papa. Ver resumen y Ejemplos 1 y 3. Tal como se anotó, la referencia a una invertasa en el contexto de inhibir una invertasa en una planta (por ejemplo una papa) que tiene ya una invertasa endógena. Esto es lo contrario de lo que se ha hecho en el contexto de la presente invención reivindicada, que incluye la inserción de una invertasa exógena en una célula de microalga que no tenía anteriormente una invertasa de tal manera que la célula puede entonces utilizar la sacarosa como una fuente de energía.

Aunque D3 menciona algas en el párrafo 191, como uno de numerosos organismos "para los propósitos de la invención" la referencia no aporta ninguna discusión de transformar con ingeniería algas con algunos genes exógenos particulares, sin tener en cuenta la sacarosa

invertasa.

En esencia, el punto de vista de su Despacho es que el conocimiento de la existencia de las microalgas y de una invertasa es suficiente para combinarlos de manera obvia y llegar de esta manera a la invención actualmente reivindicada. El solicitante no está de acuerdo, y considera que tal conclusión solo se puede alcanzarse por vía "hindsight" o en español análisis en retrospectiva con el conocimiento de la invención reivindicada y la presente descripción porque la técnica anterior citada no enseña ni sugiere realizar esta combinación o que el resultado fuera predecible.

De esta manera, los documentos citados simplemente representan la propuesta, si es que fuera así de que es posible efectuar experimentos de biología molecular en algas, pero sin aportar enseñanzas relevantes que indiquen si la sacarosa invertasa pudiera ser transformada exitosamente en las microalgas.

El solicitante ha demostrado la transformación exitosa de células de *Chorella* y *Prototheca* con una sacarosa invertasa.

A diferencia de la técnica anterior, el solicitante ha demostrado, en los ejemplos de la descripción y los experimentos detallados en la declaración anexa del Dr. Licari, la transformación exitosa de células de microalgas con un gen de sacarosa invertasa exógeno, y la expresión del gen para producir una sacarosa invertasa funcional que le permita a las células crecer y producir lípido cuando se cultivan sobre materiales de alimentación que contienen sacarosa.

Los ejemplos 22 y 23 demuestran la transformación exitosa de células *Chorella* de diferentes especies con un gen de sacarosa invertasa exógeno. El solicitante considera que una persona medianamente versada que tuviera el conocimiento de estos resultados experimentales junto con las enseñanzas de la presente solicitud habría podido producir células de *Prototheca* transformadas con una sacarosa invertasa exógena. En este contexto, el solicitante suministra una declaración del Dr. Lucari, que fue presentada en la oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos de América en referencia con una solicitud relacionada, y que confirma la transformación exitosa de las células de *Prototheca* con un gen de sacarosa invertasa exógena (ver página 2, párrafo numerado 3 hasta el párrafo al

inicio de la pagina 3).

El solicitante considera que antes de la demostración exitosa en la expresión en microalgas de la sacarosa invertasa en la presente solicitud, la persona medianamente versada no habría podido predecir, ni tampoco esperar razonablemente, que una sacarosa invertasa exógena se pudiera expresar de manera exitosa en microalgas, y que tales microalgas desarrolladas con ingeniería pudieran crecer sobre sacarosa. La biotecnología, en este caso, la ingeniería genética de microalgas, es un campo impredecible, y la técnica anterior no proporciona ninguna enseñanza que le hubiera podido aportar a la persona medianamente versada de una expectativa razonable de que las microalgas se podrían haber trabajado con ingeniería para expresar una sacarosa invertasa exógena y utilizar la sacarosa como una fuente de energía y carbono.

Las células de microalgas transformadas muestran unos rendimientos de los lípidos inesperadamente mejorados cuando se cultivan sobre material de alimentación que contiene sacarosa.

El nivel inventivo de la presente invención se evidencia adicionalmente, mediante los resultados inesperados ejemplificados del Dr. Licari. En particular, las células de *Prototheca* trabajadas con ingeniería ejemplificadas en la declaración de Licari aportan mayores rendimientos de masa de células y lípidos cuando se cultivan sobre sacarosa, comparadas con la glucosa. Además, las formas crudas de la sacarosa, tal como jugo de caña, produjeron mayores rendimientos de los que se obtuvieron con sacarosa pura.

Como se discutió anteriormente, las células de *Prototheca* ejemplificadas en la declaración de Licari fueron trabajadas con ingeniería para expresar una sacarosa invertasa exógena. Sin embargo, los experimentos discutidos en la declaración también demuestran que la sacarosa tiene ventajas inesperadamente significativas sobre la glucosa al incrementar la eficiencia con las cuales se pueden generar los lípidos mientras se utiliza un sustrato más económico. En particular, los datos demostraron que para un fermentador dado de tamaño definido, las células de microalgas trabajadas con ingeniería producen mucho más lípido (60% más) y Biomasa (36% mas) utilizando sacarosa como una fuente de energía comparada con la glucosa. Ver párrafo al inicio de la página 3 de la declaración de Licari. Más aún, el uso de jugo de caña como material de alimentación, que es la fuente de carbono menos costosa

actualmente disponible comercialmente, produjo incrementos en el peso seco de la célula y en los niveles de lípido de desde 70% a 260% comparada con el uso de sacarosa grado laboratorio, como material de alimentación. Ver párrafo entre las páginas 4 y 5 de la declaración de Licari.

Estas ventajas tienen implicaciones prácticas sustanciales para la industria de biocombustibles u otras industrias en las cuales se requieren cantidades muy grandes de lípidos para, por ejemplo, materiales de alimentación de combustible. Como se anotó en la declaración (la página 5, párrafo numerado 5) la persona medianamente versada hubiera esperado impurezas en las formas crudas de la sacarosa para inhibir, en lugar de mejorar, el crecimiento celular y la productividad de lípido. Así, la invención actualmente reivindicada aporta ventajas que no podrían haber sido predichas a partir de los documentos de la técnica anterior citada.

3. Petición subsidiaria

Solo en caso de que después de analizar los argumentos arriba citados con respecto a que se debe aceptar la solicitud divisional, su Despacho siga en la posición de no aceptarla, solicitamos respetuosamente, que se proceda a estudiar el capítulo reivindicatorio modificado que adjunto con este memorial que se enuncia como capítulo reivindicatorio modificado-Petición subsidiaria.

Dicho capítulo incluye las reivindicaciones modificadas que se presentan como respuesta a esta acción oficial junto con las presentadas en la divisional.

El examinador podrá notar, que la reivindicación 18 de la divisional fue cancelada.

Por último, es importante mencionar que el pago de las reivindicaciones adicionales fue realizado cuando se dio respuesta al primer examen de patentabilidad. Por lo tanto, no es necesario proceder con más pagos.

En este orden de ideas, tenemos que la invención propuesta por el solicitante no solamente es novedosa como ya lo ha reconocido su Despacho sino que también cumple con el requisito de nivel inventivo y de esta manera es susceptible de ostentar el título de patente de invención.

4. Solicitudes concedidas en otros países para esta misma invención.

A manera informativa, pongo en conocimiento del Examinador que las patentes EP No. 2152849 de febrero 20, 2013 y el correspondiente caso en US 8,476,059 de julio 2, 2013 equivalentes a la presente solicitud colombiana han sido otorgadas. Y otros dos casos estadounidenses US 12/772,163 y US 12/960,388 han sido aceptadas. Aún cuando entiendo que estas decisiones de ninguna manera obligan al Despacho para decidir de igual forma, considero que por tratarse de una pregunta fáctica la determinación de la existencia de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial, las decisiones de otras oficinas de patentes constituyen un antecedente persuasivo en la materia.

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:
- Copia de la declaración del Dr. Peter Licari ✓
 - Capítulo reivindicatorio modificado de la solicitud conformado por 28 reivindicaciones ✓
 - Capítulo reivindicatorio como petición subsidiaria que incluye las reivindicaciones modificadas así como las reivindicaciones de la solicitud divisional (51 reivindicaciones) ✓
 - Copia de la carátula de la patente EP No. 2152849
 - Copia de la carátula de la patente US 8,476,059
 - Copia de la carátula US 12/772,163 y
 - Copia de la carátula US 12/960,388

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of:

Donald E. Trlmbur et al.

Application No.: 12/772,163

Filed: April 30, 2010

For: PRODUCTION OF OIL IN
MICROORGANISMS

Customer No.: 89652

Confirmation No. 3208

Examiner: Valerie Bertoglio

Technology Center/Art Unit: 1632

Declaration of Peter Licari under 37
CFR 1.132

Mail Stop Amendment
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

I, Peter Licari, Ph.D. state as follows.

1. I am the Chief Technology Officer at Solazyme, Inc. I have over 20 years experience in fermentation science, biochemical engineering and bioprocessing. Prior to Solazyme, I was a Senior Vice President at Kosan Biosciences, Inc., where my responsibilities included fermentation development, purification development, and manufacturing operations from 1998 - 2008. Prior to joining Kosan, I was Director of Vaccine Manufacturing and Development at Massachusetts Biologic Laboratories, where I managed the fermentation development and manufacturing of vaccines. From 1993 to 1996, I was a Senior Scientist at BASF Bioresearch Corporation, responsible for fermentation process development. After receiving my BS and MS in Chemical Engineering from Tufts University (Medford, MA) and my PhD in Chemical Engineering, with a Minor in Biology, from the California Institute of Technology (Pasadena, CA) in

1992, I joined Merck where I was an Engineering Associate. In 2005, I obtained my MBA from Pepperdine University (Malibu, CA).

2. One of my responsibilities at Solazyme has been to implement the processes invented at Solazyme, Inc., for the production of triglyceride from sucrose using microalgae at very large scale.

3. I or others acting under my supervision have performed the following experiments. In one set of experiments we compared the ability of microalgae transformed with a sucrose invertase gene to grow on sucrose in comparison with the untransformed counterpart strain grown on glucose. In another set of experiments, we determined and compared the ability of non-engineered microalgae to use sucrose in the presence of exogenously added sucrose invertase in comparison with growth on glucose.

A codon-optimized yeast *suc2* expression cassette was transformed by means of biolistics into a microalgal strain (*Prototheca moriformis*) so that sucrose invertase would be secreted. The parent strain was one known to us to give high yields of triglyceride (lipid) when grown on glucose.

Two 7-L fermentations were conducted using a fed-batch mode where the carbon source (glucose or sucrose) was fed to the culture during the fermentation. For the glucose fermentation, the concentration of the glucose feed was about 680 g/L and for the sucrose fermentation, the concentration of the sucrose feed was about 943 g/L. This represents about a 140% increase in sugar concentration on a weight/weight basis. These concentrations represent the maximum solubility at room temperature with which we can feed the carbon source (glucose or sucrose) without having crystallization problems in the feed lines.

We found a dramatic increase in both dry cell weight and triglyceride when sucrose is used as the carbon source instead of glucose. In the sucrose culture, the triglyceride level increased by 160% and the DCW increased by about 140%.

The data showed that higher concentrations of sugar delivered to a fermenter resulted in a higher final concentration of product (g/L), higher productivity (g/LD), and higher triglyceride output. Both the glucose and sucrose fermentations were run in a 7 liter fermenter. The dry cell weight of the sucrose culture was about 36% higher than the glucose culture. The total lipid content of the sucrose culture was about 60% higher than the glucose culture. Thus for a given fermenter of defined size, we showed that we can produce far more triglyceride and biomass using sucrose rather than glucose. We have demonstrated that sucrose is not merely a simple substitution for glucose. Thus, the use of sucrose provides far more than mere "flexibility" in the carbon source.

Using this strain of *Prototheca* and sucrose as the sole carbon source, we have routinely achieved greater than 60% triglyceride by dry cell weight.

The capital costs of building a fermentation plant are quite significant. When a plant is being designed and built for a specified output volume, the capital costs can be lowered if the use of highly concentrated sugar feedstocks are a part of the initial design criteria. The most cost effective and efficient production of triglyceride in algae requires the addition of very large quantities of sugar and thus the improvements resulting from using highly concentrated sucrose feedstocks are dramatic. The higher the concentration of sugar, the less water is added to a fermenter, thereby making better use of the available volume of a fermenter. In addition, a high dry cell weight of triglyceride leads to more economical use of the fermenter.

Due to the large quantity of sugar required in an triglyceride-producing algal process and solubility differences between glucose and sucrose, sucrose provides a significant advantage in terms of titer, triglyceride productivity and plant capacity, all of which combined translate into a lower cost of production per gallon of triglyceride. As discussed above, because sucrose can be used at a much higher concentration than glucose, much higher final concentration of product (g/L), higher productivity (g/LD), and greater quantities of triglyceride produced per plant can be achieved.

4. We performed a further experiment to compare the ability of microalgae to grow on laboratory-grade sucrose versus cane juice. Cane juice is the least expensive carbon source that is commercially available today. In large part, this is due to the minimal processing required to produce cane juice from the sugar cane plant. Unlike glucose, which requires the enzymatic processing of starch, cane juice is produced by crushing sugar cane plants and collecting the juice.

This experiment used the same strain of *P. moriformis* transformed with a secretable *suc2* gene, as discussed in the above described experiment. Different cane juice feedstocks (labeled EP1, EP4, EP5, EP8, and EP9) were tested for their ability to support triglyceride production from this strain. The control flask cultures were fed laboratory-grade sucrose. The laboratory-grade sucrose feedstock was about 500 g/L and the sucrose concentration of EP1, EP4, EP5, EP8, and EP9 ranged from about 690 g/L to about 850 g/L. This represents about a 40% to about 70% increase in sugar concentration on a weight/weight basis. The cane juice feedstocks were tested for algae growth and triglyceride production in 50 mL culture medium in 250 mL shake flasks. Experiments were performed by growing this strain with each of the feedstocks as the sole carbon source. The starting concentrations of carbon in all flasks were equal and the concentration of carbon substrates (sucrose, glucose, and fructose) in each culture was measured daily, and additional feedstock was added, if necessary, to ensure the culture was never carbon depleted. All the experiments were carried out in duplicate, and the results averaged. All flasks were grown under the same conditions on a rotary shaker. Total dry cell weight (DCW, g/L) was measured as a means of determining biomass accumulation under all the conditions tested. Because triglyceride is sequestered inside the cells, DCW is a measurement of both cell growth and triglyceride production. The flask cultures fed with the cane juice feedstocks achieved maximum dry cell weights that were about 70% to about 250% higher than the maximum DCW of the control flask cultures fed with laboratory-grade sucrose. Similarly, the triglyceride production was about 80% to about 260% higher in the cane juice fed cultures. My colleagues and I believe that the additional compounds and trace elements in cane juice are what caused the 70% to 260% increase in DCW and triglycerides. The differences in the sugar concentrations between the sucrose feedstock and cane juice feedstocks

cannot explain the differences observed in the DCW and triglyceride production. The sugar concentration of the cane juice feedstocks (690-850 g/L) was about 40% to about 70% higher than the sugar concentration of the sucrose feedstock (500 g/L). The EP1 fed culture produced DCW that was 1.7 fold higher and triglyceride titer that was 1.8 fold higher than the laboratory-grade sucrose fed culture. The EP9 fed culture produced cultures with DCW that was 3.5 fold higher and triglyceride titer that was 3.6 fold higher. Thus with an increase in sucrose concentrations of only between 40% to 70%, we achieved increases in DCW and triglyceride levels that were 70% to 260% higher. These increases in DCW and triglyceride production were unexpected and surprising. The higher sucrose concentration cannot by itself account for the higher production of biomass and triglyceride. My colleagues and I believe that there are additional nutrients in the cane juice that promote higher DCW and triglyceride production.

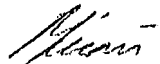
5. The results discussed in this declaration would have been surprising and unexpected to an artisan of ordinary skill at the time the invention described in the above-captioned application was made. I do not believe that artisan would have thought it likely that laboratory-grade sucrose would provide better results in these fermentations than laboratory-grade glucose. I believe that that artisan would have been even more surprised that even better results could be obtained using sugar cane juice instead of laboratory-grade sucrose. In fermentation sciences, it is important to control the media composition very carefully, so an artisan of ordinary skill would, in my opinion, have believed that using laboratory-grade sucrose would provide better results than using sugar cane juice as a source of the sucrose, based on the varying composition of sucrose and potential for other undesired components in the latter. For example, it is well known that the presence of lignin, furfurals, and other compounds in cellulose feedstocks has a significantly negative impact on the productivity of cellulosic ethanol fermentations compared to fermentations using pure sugars at the same concentration. Based on analyses of various cane juice feedstocks, I believe these improved results may result from the presence of additional nutrients in cane juice relative to laboratory-grade sucrose, such as nitrogen and trace elements. Use of cane juice yields higher productivity than laboratory-grade sucrose and so eliminates or reduces the need for an expensive component such as laboratory-grade sucrose and potentially other expensive

21

components (e.g., nitrogen source and/or trace elements), thus reducing overall manufacturing costs.

6. I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made based on information and belief are true, and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Respectfully submitted,


Peter Licari, Ph.D.

Alston + Bird LLP
275 Middlefield Road, Menlo Park, CA 94025-4004
Tel 650 838 2038

REIVINDICACIONES MODIFICADAS Solicitud de patente No. 09.149.183

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

Cultivar heterotróficamente 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, donde las microalgas son del género *Chlorella* or *Prototheca*; 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 μ M 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 μ M 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 las microalgas acumulan un 60% o más de su peso de células secas como lípido
10. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa adicional de formar un producto alimenticio del lípido obtenido de las microalgas.
11. 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.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las microalgas se seleccionan del grupo que consiste de *Chlorella emersonii*, *Chlorella minutissima*, y *Chlorella protothecoides*.
13. El método de la reivindicación 12, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides*.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las microalgas son *Prototheca moriformis*.
15. Un lípido producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Un método para producir combustible que comprende:
- (a) cultivar heterotróficamente una población de microalgas, del género *Chlorella* o *Prototheca* 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, donde una o más reacciones químicas se seleccionan de transesterificación, hidrotratamiento, hidroprocesamiento, licuefacción indirecta, desoxigenación, isomerización, hidrocracking, cracking catalítico de fluido, hidrodeshidrogenación, hidrodeshidrosulfurización o hidrogenación,
- por lo cual se produce el combustible.
17. El método de la reivindicación 16, en donde una o más reacciones químicas se seleccionan del grupo que consiste de transesterificación, hidrotratamiento, hidrocracking, desoxigenación e isomerización.
18. El método de la reivindicación 16 o 17, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides*.

19. El método de la reivindicación 18, en donde las microalgas son *Prototheca moriformis*.
20. Una composición de alcanos o ésteres de ácidos grasos hechos de acuerdo con el método de la reivindicación 16.
21. El método de la reivindicación 11, 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.
22. El método de la reivindicación 21, en donde las microalgas usadas para producir los componentes lípidos y las microalgas del segundo cultivo de microalgas son de las mismas especies.
23. 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, donde la célula de microalga es del género *Chlorella* o *Prototheca*.
24. La célula de microalga de la reivindicación 23, en donde la enzima de sacarosa invertasa es una enzima de sacarosa invertasa secretable.
25. La célula de microalga de la reivindicación 23 o 24, en donde la microalga es seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella emersonii*, *Chlorella minutissima* y *Chlorella protothecoides*.
26. La célula de microalga de la reivindicación 25, en donde la microalga es *Chlorella protothecoides*.

27. La célula de microalga de la reivindicación 23 o 24, en donde la microalga es *Prototheca moriformis*.

28. Un lípido producido por una célula de microalga de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS Solicitud de patente No. 09.149.183**PETICIÓN SUBSIDIARIA**

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

Cultivar heterotróficamente 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, donde las microalgas son del género *Chlorella* or *Prototheca*; 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 μ M 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 μ M 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 las microalgas acumulan un 60% o más de su peso de células secas como lípido
10. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa adicional de formar un producto alimenticio del lípido obtenido de las microalgas.
11. 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.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las microalgas se seleccionan del grupo que consiste de *Chlorella emersonii*, *Chlorella minutissima*, y *Chlorella protothecoides*.
13. El método de la reivindicación 12, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides*.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las microalgas son *Prototheca moriformis*.

15. Un lípido producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

16. Un método para producir combustible que comprende:

(a) cultivar heterotróficamente una población de microalgas, del género *Chlorella* o *Prototheca* 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, donde una o más reacciones químicas se seleccionan de transesterificación, hidrotratamiento, hidroprocesamiento, licuefacción indirecta, desoxigenación, isomerización, hidrocracking, cracking catalítico de fluido, hidrodeshidrogenación, hidrodeshidrosulfurización o hidrogenación,

por lo cual se produce el combustible.

17. El método de la reivindicación 16, en donde una o más reacciones químicas se seleccionan del grupo que consiste de transesterificación, hidrotratamiento, hidrocraqueo, desoxigenación e isomerización.

18. El método de la reivindicación 16 o 17, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides*.

19. El método de la reivindicación 18, en donde las microalgas son *Prototheca moriformis*.
20. Una composición de alcanos o ésteres de ácidos grasos hechos de acuerdo con el método de la reivindicación 16.
21. El método de la reivindicación 11, 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.
22. El método de la reivindicación 21, en donde las microalgas usadas para producir los componentes lípidos y las microalgas del segundo cultivo de microalgas son de las mismas especies.
23. 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, donde la célula de microalga es del género *Chlorella* o *Prototheca*.
24. La célula de microalga de la reivindicación 23, en donde la enzima de sacarosa invertasa es una enzima de sacarosa invertasa secretable.
25. La célula de microalga de la reivindicación 23 o 24, en donde la microalga es seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella emersonii*, *Chlorella minutissima* y *Chlorella protothecoides*.
26. La célula de microalga de la reivindicación 25, en donde la microalga es *Chlorella protothecoides*.

27. La célula de microalga de la reivindicación 23 o 24, en donde la microalga es *Prototheca moriformis*.
28. Un lípido producido por una célula de microalga de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27.
29. 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.
30. El método de la reivindicación 29, en donde el material celulósico despolimerizado comprende xilosa.
31. El método de la reivindicación 30, 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.
32. El método de la reivindicación 29, en donde el material celulósico despolimerizado comprende glucosa y xilosa.
33. El método de la reivindicación 29, en donde el medio de cultivo es agénico.
34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 33, 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.

35. El método de la reivindicación 34, en donde el material celulósico despolimerizado es bagazo de caña.

36. El método de la reivindicación 34, en donde el material celulósico despolimerizado es fibra de maíz.

37. El método de la reivindicación 34, en donde el material celulósico despolimerizado es miscanto.

38. El método de la reivindicación 29, en donde las microalgas son cultivadas bajo condiciones limitadas de nitrógeno.

39. El método de la reivindicación 29, en donde el lípido comprende 50% o más de C18:1.

40. El método de la reivindicación 29, en donde el lípido comprende 3% o más de C18:0 y 8% o más de C16:0.

41. El método de la reivindicación 29, en donde las microalgas acumulan 65% o más de su peso de células secas como lípido.

42. El método de la reivindicación 41, en donde las microalgas acumulan 70% o más de su peso de células secas como lípido.

43. El método de la reivindicación 29, en donde separar el lípido de las microalgas comprende lisar las microalgas y recuperar el lípido usando un solvente orgánico.
44. El método de la reivindicación 43, en donde el solvente orgánico es hexano.
45. El método de la reivindicación 29, que comprende además tratar el material celulósico con una enzima produciendo así el material celulósico despolimerizado del medio de cultivo.
46. El método de las reivindicaciones 29 a 45, en donde las microalgas son del gen *Chlorella* o *Prototheca*.
47. El método de la reivindicación 29 a 45, en donde las microalgas son *Chlorella protothecoides*.
48. El método de la reivindicación 29 a 45, en donde las microalgas son *prototheca moriformis*.
49. El método de la reivindicación 29, en donde la etapa de cultivar se lleva a cabo en la ausencia de luz.
50. El método de la reivindicación 29, en donde las microalgas son heterótrofas obligadas.
51. Un lípido producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 50.



(11) **EP 2 152 849 B1**

(12) **EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

- (45) Date of publication and mention of the grant of the patent:
20.02.2013 Bulletin 2013/08

(21) Application number: **08769988.0**

(22) Date of filing: **02.06.2008**
- (51) Int Cl.:
C12P 5/02 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
C12N 1/32 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C10L 1/02 (2006.01)

(86) International application number:
PCT/US2008/065563

(87) International publication number:
WO 2008/151149 (11.12.2008 Gazette 2008/50)

(54) **Production of oil in microorganisms**
Ölproduktion in Mikroorganismen
Production d'huile dans des micro-organismes

- (84) Designated Contracting States:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
- (30) Priority: **01.06.2007 US 941581 P**
10.07.2007 US 959174 P
27.08.2007 US 968291 P
28.01.2008 US 24069
- (43) Date of publication of application:
17.02.2010 Bulletin 2010/07
- (60) Divisional application:
11158642.6 / 2 351 845
- (73) Proprietor: **Solazyme, Inc.**
South San Francisco, CA 94080 (US)
- (72) Inventors:
• **TRIMBUR, Donald, E.**
South San Francisco, California 94080-1906 (US)
• **IM, Chung-soon**
South San Francisco, California 94080-1906 (US)
• **DILLON, Harrison, F.**
San Francisco, California 94080-1906 (US)
• **DAY, Anthony, G.**
San Francisco, California 94080-1906 (US)
• **FRANKLIN, Scott**
San Francisco, California 94080-1906 (US)
• **CORAGLIOTTI, Anna**
San Francisco, California 94080-1906 (US)

- (74) Representative: **Marshall, Cameron John**
Carpmaels & Ransford
One Southampton Row
London
WC1B 5HA (GB)
- (56) References cited:
EP-A1- 1 681 337 EP-A1- 1 741 767
WO-A1-2008/083352 WO-A2-2007/038566
US-A1- 2004 235 123 US-A1- 2005 112 735
US-A1- 2006 199 984 US-A1- 2007 004 016
US-A1- 2007 118 916
- **XU H ET AL: "High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 126, no. 4, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 499-507, XP024956582, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2006.05.002 [retrieved on 2006-12-01]**
 - **LI XIUFENG ET AL: "Large-scale biodiesel production from microalga Chlorella protothecoides through heterotrophic cultivation in bioreactors", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING (ONLINE), WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, [Online] vol. 98, no. 4, 11 May 2007 (2007-05-11), pages 764-771, XP002546299, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.21489 [retrieved on 2007-05-11]**

Note: Within nine months of the publication of the mention of the grant of the European patent in the European Patent Bulletin, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to that patent, in accordance with the Implementing Regulations. Notice of opposition shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

EP 2 152 849 B1



US008476059B2

(12) **United States Patent**
Trimbur et al.

(10) **Patent No.:** **US 8,476,059 B2**
(45) **Date of Patent:** ***Jul. 2, 2013**

- (54) **SUCROSE FEEDSTOCK UTILIZATION FOR OIL-BASED FUEL MANUFACTURING**
- (75) **Inventors:** **Donald E. Trimbur**, South San Francisco, CA (US); **Chung-Soon Im**, South San Francisco, CA (US); **Harrison F. Dillon**, South San Francisco, CA (US); **Anthony G. Day**, South San Francisco, CA (US); **Scott Franklin**, South San Francisco, CA (US); **Anna Coragliotti**, South San Francisco, CA (US)
- (73) **Assignee:** **Solazyme, Inc.**, South San Francisco, CA (US)
- (*) **Notice:** Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

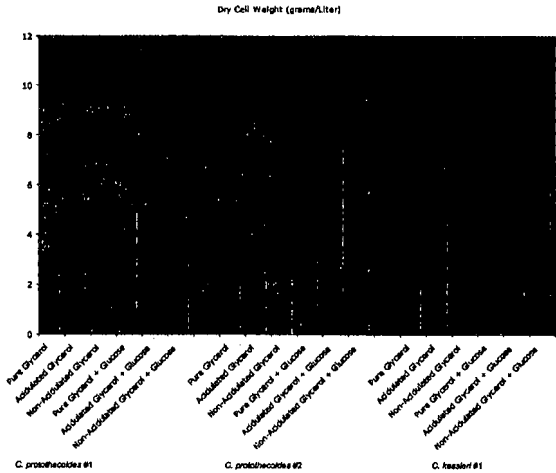
This patent is subject to a terminal disclaimer.
- (21) **Appl. No.:** **12/131,793**
- (22) **Filed:** **Jun. 2, 2008**
- (65) **Prior Publication Data**
US 2009/0035842 A1 Feb. 5, 2009
- Related U.S. Application Data**
- (66) Substitute for application No. 60/968,291, filed on Aug. 27, 2007.
- (60) Provisional application No. 60/941,581, filed on Jun. 1, 2007, provisional application No. 60/959,174, filed on Jul. 10, 2007, provisional application No. 61/024,069, filed on Jan. 28, 2008.
- (51) **Int. Cl.**
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

- (52) **U.S. Cl.**
USPC **435/257.1; 435/196; 435/197; 435/134; 435/69.1; 536/23.1; 536/23.2**
- (58) **Field of Classification Search**
None
See application file for complete search history.
- (56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS
2,235,056 A 3/1941 Walmsley
3,320,693 A 5/1967 IShirota et al.
3,475,274 A 10/1969 Harned
(Continued)
- FOREIGN PATENT DOCUMENTS**
CN 1940021 A 4/2007
CN 101037639 A 9/2007
(Continued)
- OTHER PUBLICATIONS**
Miao et al., 2004, Journal of Biotechnology, 110: 85-93.*
(Continued)

Primary Examiner — Valarie Bertoglio
(74) *Attorney, Agent, or Firm* — Alston & Bird LLP

- (57) **ABSTRACT**
The invention provides methods of manufacturing oils and oil-based products such as transportation fuels, industrial chemicals, edible oils, lubricants and plastics using sugar cane, sugar beets, and cane/beet agricultural processing byproducts as a feedstock for bioproduction processes. The disclosed processes utilize oil-bearing microbes as a conversion technology to convert chemical energy produced by sugar cane and sugar beets into energy-containing oils and oil derivatives. Also provided herein are oil-bearing microbes containing one or more exogenous sucrose utilization genes.
- 25 Claims, 29 Drawing Sheets**





US 20100323413A1

(19) **United States**
(12) **Patent Application Publication**
Trimbur et al. (10) **Pub. No.: US 2010/0323413 A1**
(43) **Pub. Date: Dec. 23, 2010**

(54) **PRODUCTION OF OIL IN MICROORGANISMS**

(75) Inventors: **Donald E. Trimbur**, Palo Alto, CA (US); **Chung-Soon Im**, Palo Alto, CA (US); **Harrison F. Dillon**, San Mateo, CA (US); **Anthony G. Day**, San Francisco, CA (US); **Scott Franklin**, La Jolla, CA (US); **Anna Coragliotti**, San Francisco, CA (US)

Correspondence Address:
Townsend and Townsend and Crew LLP/Solazyme, Inc.
Two Embarcadero Center, Eighth Floor
San Francisco, CA 94111-3834 (US)

(73) Assignee: **Solazyme, Inc.**, South San Francisco, CA (US)

(21) Appl. No.: **12/772,163**

(22) Filed: **Apr. 30, 2010**

Related U.S. Application Data

(63) Continuation of application No. 12/131,793, filed on Jun. 2, 2008.
(60) Provisional application No. 60/941,581, filed on Jun. 1, 2007, provisional application No. 60/959,174, filed on Jul. 10, 2007, provisional application No. 60/968,291, filed on Aug. 27, 2007, provisional application No. 61/024,069, filed on Jan. 28, 2008.

Publication Classification

(51) **Int. Cl.**
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 1/13 (2006.01)
(52) **U.S. Cl.** **435/134; 435/257.2**

(57) **ABSTRACT**

The invention provides methods of manufacturing oils and oil-based products such as transportation fuels, industrial chemicals, edible oils, lubricants and plastics using sucrose feedstocks from sugar cane, sugar beets, and molasses for bioproduction processes. The disclosed processes utilize oleaginous microbes as a conversion technology to convert chemical energy produced by sugar cane, molasses and sugar beets into energy-containing oils and oil derivatives. Also provided herein are oleaginous microbes containing one or more exogenous sucrose utilization genes..



US 20120122192A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication**
Trimbur et al.

(10) **Pub. No.: US 2012/0122192 A1**

(43) **Pub. Date: May 17, 2012**

- (54) **EDIBLE OILS AND FOOD COMPOSITIONS FROM HETEROTROPHIC MICROORGANISMS**
- (75) Inventors: **Donald E. Trimbur**, Palo Alto, CA (US); **Chung-Soon Im**, Palo Alto, CA (US); **Harrison F. Dillon**, San Mateo, CA (US); **Anthony G. Day**, San Francisco, CA (US); **Scott Franklin**, La Jolla, CA (US); **Anna Coraghlotti**, San Francisco, CA (US)
- (73) Assignee: **SOLAZYME, INC.**, SOUTH SAN FRANCISCO, CA (US)
- (21) Appl. No.: **12/960,388**
- (22) Filed: **Dec. 3, 2010**
- (60) Provisional application No. 61/024,069, filed on Jan. 28, 2008, provisional application No. 60/968,291, filed on Aug. 27, 2007, provisional application No. 60/959,174, filed on Jul. 10, 2007, provisional application No. 60/941,581, filed on Jun. 1, 2007.
- (51) **Int. Cl.**
C12N 1/13 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
A23D 9/02 (2006.01)
- (52) **U.S. Cl.** **435/257.2; 554/227; 554/224; 554/223; 435/257.1**
- (57) **ABSTRACT**
The invention provides methods of manufacturing oils and oil-based products such as transportation fuels, industrial chemicals, edible oils, lubricants and plastics using sugar cane, sugar cane juice, corn steep liquor, corn starch or depolymerized cellulosic material as a feedstock for bioproduction processes. The disclosed processes utilize oil-bearing microbes as a food source and as a conversion technology to convert chemical energy produced by various fixed carbon sources into edible oils.

Related U.S. Application Data

- (63) Continuation of application No. 12/131,793, filed on Jun. 2, 2008.