Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

Folio 536.

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** PCT 09-149183

54. **TÍTULO** PRODUCCION DE ACEITE EN MICROORGANISMOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** SOLAZYME, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS

74. **APODERADO** ALVARO CORREA ORDOÑEZ

22. **BOGOTÁ, D.C.,** Diciembre 30, 2009

Folio, Poder, Cert.
01-01-2009

(FORMA P-10)

PETITO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha: 2009-12-30 15:26:24 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTES II Lve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 436

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE :

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad
[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: **SOLAZYME, INC.**
Dirección: 561 Eccles Avenue South San Francisco, California 94080 (US)
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-Mail

IDENTIFICACION
C.C. [ ] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6
Teléfono: 6341500 Fax: 3762211
E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION
C.C. [X] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número 79.143.366 Usaquén TP 20281

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: TRIMBUR, Donald, E.; IM, Chung-soon; DILLON, Harrison, F.; DAY, Anthony, G.; FRANKLIN, Scott; CORAGLIOTTI, Anna
Dirección: 561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080-1906, US; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080-1906, US; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906, US; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906, US; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906, US; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906, US
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

(5) PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/065563 Fecha 02-06-2008
Publicación Internacional No. WO 2008/151149 Fecha 11-12-2008

(6) Título (54) PRODUCCION DE ACEITE EN MICROORGANISMOS (F. 440).

(7) Clasificación Internacional (51) C12M 1/100, C12P/500

(8) Prioridad

SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	01-06-2007	60/941,581
US	10-07-2007	60/959,174
US	27-08-2007	60/968,291
US	28-01-2008	61/024,069

(9) Comprobante de pago No. En hoja anexa **Fecha** Diciembre 29, 2009

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) ANEXOS

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [ ] Poderes, si fuere el caso
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [X] Arte final 12 x 12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros: Listado de Secuencias y Extractos

11 FIGURA CARATERISTICA

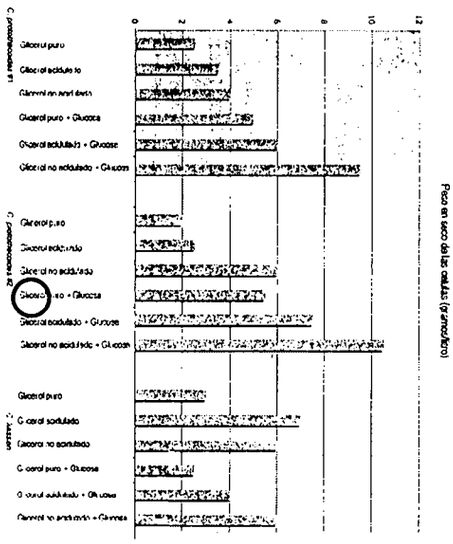


Figura 1

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

PCT/US2008/065563

N/Ref.: P2009/000285

RELACION DE RECIBOS A LA SIC

09-72,973
09-72,974
09-72,975
09-72,976
09-72,977
09-72,978
09-72,979
09-72,980
09-72,981
09-72,982
09-72,983
09-72,984
09-72,985
09-72,986
09-72,987
09-80,462
09-80,258
09-88,854
09-88,792
09-88,719

4

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-149183- -00000-0000

Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NULVASCR
Tra 11 PATENTES II Lve 378 FASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios 436

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,973
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30	PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
			TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

5

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-149183- -00000-0000

Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NULVASCR
Tra 11 PATENTES II Lve 378 FASLNACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 436

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,974
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30	PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
			TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

6

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,975
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009 12 30 15 26 24 Dep 2020 DIR NUEVAS CR
Tra 11 PATENTES Lve 378 PASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 436

******* C O N S I G N A C I O N *******

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

******* C O N C E P T O *******

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,976
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NULIVASION
Tra 11 PATENTES II Eve 378 FASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios 436

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,977
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NOVASCR
Usu 11 PATENTLIYR Clase 378 PASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 436

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

01

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-149183- -00000-0000

Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep: 2020 DIR NUEVA SEDE
Usu: 11 PATENTEYII Eve: 378 PASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 436

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,978
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450/8143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

2009/014

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,979
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha: 2009-12-30 15:26:24 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTE/VE Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 441 PRESENTACION Folios: 436

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,980
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NVE VASCR
Tipo 11 PATENTE,YR Eve 378 PASE NACIONAL1
Act 411 PRESENTACION Folios 436

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

12

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NULVASCR
Cla 11 PATENTLIYII Lve 378 FASLNACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 436

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,981
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

13

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,982
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fec 08 2009 12:30:15 26 24 Dep 2020 DIR NUEVAS CR
Tid 11 PATENTES Lve 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 436

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30	PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
			TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

14

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NOLVASCR
Tra 11 PATENTES II Eve 378 FASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios 436

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,983
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2009/014 15

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 8001760?

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-149183- -00000-0000

Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NUEVAS CR
Tra 11 PATENTES Lve 378 PASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 436

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,984
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2009/014

16

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,985
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NUEVA SEDE
Usu 11 PATENTILYH Lve 378 PASLNACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 436

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

17

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,986
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NUEVASCR
Usu 11 PATRICIA Tve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 436

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2009/014 18

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,987
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009 12 30 15 26 24 Dep 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTELYII Lve 378 FASLNACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 436

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

101

20/09/015

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NUEVASCR
Usu 11 PATENTEYH Eve 378 PASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 436

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 80,462
FECHA : OCTUBRE 26 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	121953904	26/10/2009	$ 8,821,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54	INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI	25,000.00
			TOTAL : $	25,000.00

SON: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2009/015

20

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 80,258
FECHA : OCTUBRE 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NULVASCR
Hoja 11 PATENTES Lve 378 FASLNACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 436

***** C O N S I G N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	121953904	26/10/2009	54,821,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL : $	5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

21

2009/016

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-149183- -00000-0000
Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Cta: 11 PATENTES YB Liv: 378 FASE NACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 436

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 88,854
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	53918196	25/11/2009	70,018,300.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	85 EXAMEN DE PATENTABILIDAD DE INVEN	452,000.00
		TOTAL : $	452,000.00

SON: CUATROCIENTOS CINCUENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2009/016 22

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-149183- -00000-0000

Fecha: 2009-12-30 15:26:24 Dep: 2020 DIR NUEVAS CR
Cta: 11 PATENTES Cve: 378 PASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 436

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 88,792
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	53918196	25/11/2009	70,018,300.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-08 PRORROGA DE TERMINOS	31 PRORROGA DE TERMINOS	81,000.00
		TOTAL : $	81,000.00

SON: OCHENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2009/01673

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-149183- -00000-0000

Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NUEVAS CR
Tra 11 PATENTES Y II Eve 378 PASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios 436

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 88,719
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	53918196	25/11/2009	70,018,300.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	7,000.00
		TOTAL : $	7,000.00

SON: SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ___ PCT X MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional : C12M 1/100, C12P 5/00

(71)Solicitante(s) **SOLAZYME, INC.**

(72) Inventor(es) TRIMBUR, Donald, E.; IM, Chung-soon; DILLON, Harrison, F.; DAY, Anthony, G.; FRANKLIN, Scott; CORAGLIOTTI, Anna

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	32) *Fecha*	(33) *País*
	60/941,581	01-06-2007	US
	60/959,174	10-07-2007	US
	60/968,291	27-08-2007	US
	61/024,069	28-01-2008	US

(85) Fecha inicio fase nacional: 01-06-2010

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 02-06-2008
No. de solicitud PCT/US2008/065563

(87) Publicación internacional
Fecha: 11-12-2008
N° publicación: WO 2008/151149

(54) Titulo: **PRODUCCION DE ACEITE EN MICROORGANISMOS**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ___ PCT X MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:
(51) Clasificación Internacional : C12M 1/100, C12P 5/00

(71)Solicitante(s) **SOLAZYME, INC.**

(72) Inventor(es) TRIMBUR, Donald, E.; IM, Chung-soon; DILLON, Harrison, F.; DAY, Anthony, G.; FRANKLIN, Scott; CORAGLIOTTI, Anna

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad	(31) **No. Prioridad**	32) **Fecha**	(33) **País**
	60/941,581	01-06-2007	US
	60/959,174	10-07-2007	US
	60/968,291	27-08-2007	US
	61/024,069	28-01-2008	US

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 01-06-2010
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud:02-06-2008
No. de solicitud PCT/US2008/065563

(87) Publicación internacional:
Fecha: 11-12-2008
No. Publicación : WO 2008/151149

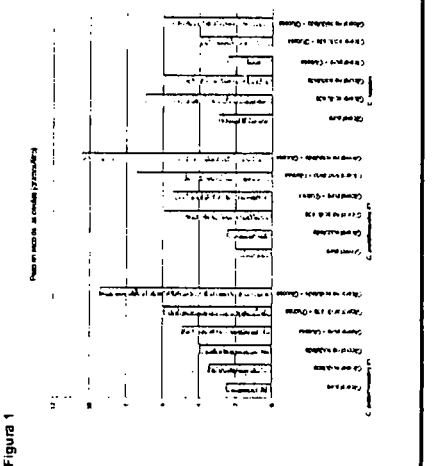


Figura 1

Titulo: **PRODUCCION DE ACEITE EN MICROORGANISMOS**

(57) Resumen: 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 exportación tales como diesel renovable, biodiesel y combustible de jet renovable.

CONTINUA AL RESPALDO ...

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad

(31) *No.*	32) *Fecha*	(33) *País*
60/941,581	01-06-2007	US
60/959,174	10-07-2007	US
60/968,291	27-08-2007	US
61/024,069	28-01-2008	US

(51) Int Cl: **C12M 1/100, C12P 5/00**

(71)Solicitante(s) **SOLAZYME, INC.**

(72) Inventor(es) TRIMBUR, Donald, E.; IM, Chung-soon; DILLON, Harrison, F.; DAY, Anthony, G.; FRANKLIN, Scott; CORAGLIOTTI, Anna

(74) Apoderado: **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 01-06-2010
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 02-06-2008
No. de solicitud PCT/US2008/065563

(87) Publicación internacional
Fecha: 11-12-2008
N° publicación: WO 2008/151149

(54) Titulo: **PRODUCCION DE ACEITE EN MICROORGANISMOS**

Reivindicación(es):

1. Un método para producir diesel renovable, caracterizado porque comprende:

(a) cultivar una población de microorganismos en presencia de una fuente fija de carbono, en donde:

(i) los microorganismos acumulan por lo menos 10% de su peso seco de células como lípidos y

(ii) la fuente fija de carbono es seleccionada del grupo que consiste de glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarosa, melazas, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, fructosa, arabinosa, manosa, acetato y cualquier combinación de las anteriores;

(b) aislar los componentes lípidos de los microorganismos cultivados y

(c) someter los componentes de lípido aislados a una o más reacciones químicas para generar alcanos de cadena recta,

mediante el cual se produce el diesel renovable.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 December 2008 (11.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/151149 A2

(51) International Patent Classification:
C12M 1/00 (2006.01) *C12P 5/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/065563

(22) International Filing Date: 2 June 2008 (02.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/941,581	1 June 2007 (01.06.2007)	US
60/959,174	10 July 2007 (10.07.2007)	US
60/968,291	27 August 2007 (27.08.2007)	US
61/024,069	28 January 2008 (28.01.2008)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **SOLAZYME, INC.** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **TRIMBUR, Donald, E.** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080-1906 (US). **IM, Chung-soon** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080-1906 (US). **DILLON, Harrison, F.** [US/US]; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906 (US). **DAY, Anthony, G.** [US/US]; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906 (US). **FRANKLIN, Scott** [US/US]; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906 (US). **CORAGLIOTTI, Anna** [US/US]; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906 (US).

(74) Agents: **TERMES, Lance, A.** et al.; Townsend And Townsend And Crew Llp, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, California 94111 (US).

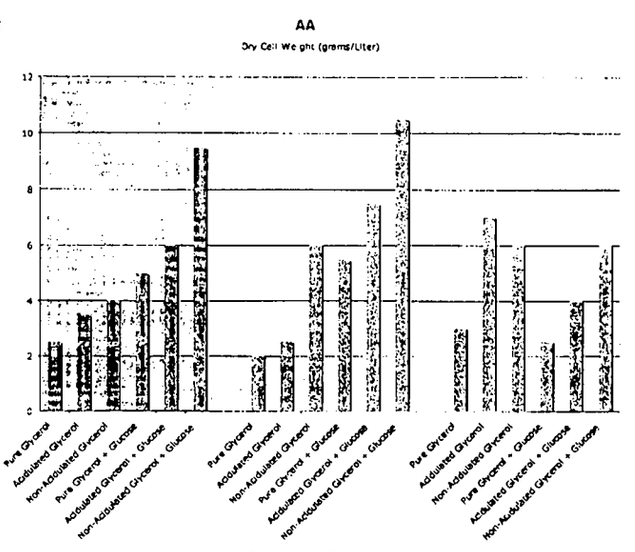
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

[Continued on next page]

(54) Title: PRODUCTION OF OIL IN MICROORGANISMS

Figure 1



(57) Abstract: The invention provides methods and compositions useful for the production of oil, fuels, oleochemicals, and other compounds in microorgansims. In particular, the invention provides oil-bearing microorganisms and methods of low cost cultivation of such microorganisms. The invention also provides microbial cells containing exogenous genes encoding, for example, a lipase, sucrose transporter, sucrose invertase, fructokinase, a polysaccharide-degrading enzyme, fatty acyl-ACP thioesterase, fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, fatty acyl-CoA reductase, fatty aldehyde reductase, fatty aldehyde decarbonylase, and/or an acyl carrier protein. The invention also includes methods of manufacturing transportation fuels such as renewable diesel, biodiesel, and renewable jet fuel.

WO 2008/151149 A2

WO 2008/151149 A2



FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

PRODUCTION OF OIL IN MICROORGANISMS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims priority to U.S. provisional patent application Nos.: 60/941,581, filed June 1, 2007; 60/959,174, filed July 10, 2007; 60/968,291, filed August 27, 2007; and 61/024,069, filed January 28, 2008, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] This disclosure relates to the production of oils, fuels, and oleochemicals made from microorganisms. In particular, the disclosure relates to oil-bearing microorganisms, including microalgae, yeast and fungi, and to methods of cultivating such microorganisms for the production of useful compounds, including lipids, fatty acid esters, fatty acids, aldehydes, alcohols, and alkanes, for use in industry or as an energy or food source. The microorganisms of the invention can be selected or genetically engineered for use in the methods or other aspects of the invention described herein.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Fossil fuel is a general term for buried combustible geologic deposits of organic materials, formed from decayed plants and animals that have been converted to crude oil, coal, natural gas, or heavy oils by exposure to heat and pressure in the earth's crust over hundreds of millions of years.

[0004] In common dialogue, fossil fuel, also known as mineral fuel, is used synonymously with other hydrocarbon-containing natural resources such as coal, oil and natural gas. The utilization of fossil fuels has enabled large-scale industrial development and largely supplanted water driven mills, as well as the combustion of wood or peat for heat. Fossil fuels are a finite, non-renewable resource.

[0005] When generating electricity, energy from the combustion of fossil fuels is often used to power a turbine. Older generations often used steam generated by the burning of the fuel to turn the turbine, but in newer power plants, the gases produced by burning of the fuel turn a gas turbine directly. With global modernization in the 20th and 21st centuries, the thirst for energy from fossil fuels, especially gasoline derived from oil, is one of the causes of major regional and global conflicts.

30

WIPO 215 pages

PDF (2

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 December 2008 (11.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/151149 A2

(51) International Patent Classification:
C12M 1/00 (2006.01) *C12P 5/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/065563

(22) International Filing Date: 2 June 2008 (02.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/941,581	1 June 2007 (01.06.2007)	US
60/959,174	10 July 2007 (10.07.2007)	US
60/968,291	27 August 2007 (27.08.2007)	US
61/024,069	28 January 2008 (28.01.2008)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **SOLAZYME, INC.** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **TRIMBUR, Donald, E.** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080-1906 (US). **IM, Chung-soon** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, California 94080-1906 (US). **DILLON, Harrison, F.** [US/US]; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906 (US). **DAY, Anthony, G.** [US/US]; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906 (US). **FRANKLIN, Scott** [US/US]; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906 (US). **CORAGLIOTTI, Anna** [US/US]; 561 Eccles Avenue, San Francisco, California 94080-1906 (US).

(74) Agents: **TERMES, Lance, A.** et al.; Townsend And Townsend And Crew Llp, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, California 94111 (US).

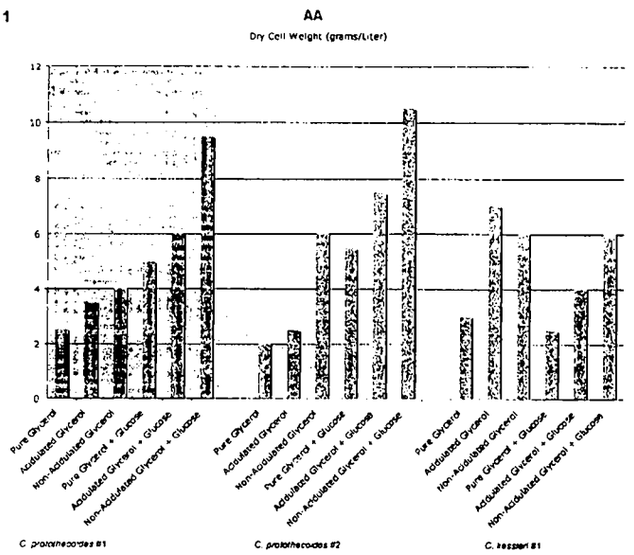
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

[Continued on next page]

(54) Title: PRODUCTION OF OIL IN MICROORGANISMS

Figure 1



(57) Abstract: The invention provides methods and compositions useful for the production of oil, fuels, oleochemicals, and other compounds in microorgansims. In particular, the invention provides oil-bearing microorganisms and methods of low cost cultivation of such microorganisms. The invention also provides microbial cells containing exogenous genes encoding, for example, a lipase, sucrose transporter, sucrose invertase, fructokinase, a polysaccharide-degrading enzyme, fatty acyl-ACP thioesterase, fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, fatty acyl-CoA reductase, fatty aldehyde reductase, fatty aldehyde decarbonylase, and/or an acyl carrier protein. The invention also includes methods of manufacturing transportation fuels such as renewable diesel, biodiesel, and renewable jet fuel.

WO 2008/151149 A2

WO 2008/151149 A2



FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

PRODUCTION OF OIL IN MICROORGANISMS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims priority to U.S. provisional patent application Nos.: 60/941,581, filed June 1, 2007; 60/959,174, filed July 10, 2007; 60/968,291, filed August 27, 2007; and 61/024,069, filed January 28, 2008, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] This disclosure relates to the production of oils, fuels, and oleochemicals made from microorganisms. In particular, the disclosure relates to oil-bearing microorganisms, including microalgae, yeast and fungi, and to methods of cultivating such microorganisms for the production of useful compounds, including lipids, fatty acid esters, fatty acids, aldehydes, alcohols, and alkanes, for use in industry or as an energy or food source. The microorganisms of the invention can be selected or genetically engineered for use in the methods or other aspects of the invention described herein.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Fossil fuel is a general term for buried combustible geologic deposits of organic materials, formed from decayed plants and animals that have been converted to crude oil, coal, natural gas, or heavy oils by exposure to heat and pressure in the earth's crust over hundreds of millions of years.

[0004] In common dialogue, fossil fuel, also known as mineral fuel, is used synonymously with other hydrocarbon-containing natural resources such as coal, oil and natural gas. The utilization of fossil fuels has enabled large-scale industrial development and largely supplanted water driven mills, as well as the combustion of wood or peat for heat. Fossil fuels are a finite, non-renewable resource.

[0005] When generating electricity, energy from the combustion of fossil fuels is often used to power a turbine. Older generations often used steam generated by the burning of the fuel to turn the turbine, but in newer power plants, the gases produced by burning of the fuel turn a gas turbine directly. With global modernization in the 20th and 21st centuries, the thirst for energy from fossil fuels, especially gasoline derived from oil, is one of the causes of major regional and global conflicts.

[0006] The burning of fossil fuels by humans is the largest source of emissions of carbon dioxide, which is one of the greenhouse gases that allows radiative forcing and contributes to global warming. In the United States, more than 90% of greenhouse gas emissions come from the combustion of fossil fuels. In addition, other air pollutants, such as nitrogen oxides, sulfur dioxide, volatile organic compounds (VOCs), and heavy metals are produced.

[0007] Human activity raises levels of greenhouse gases primarily by releasing carbon dioxide from fossil fuel combustion, but other gases, e.g., methane, are not negligible. The concentrations of several greenhouse gases have increased over time due to human activities, such as burning of fossil fuels and deforestation leading to higher carbon dioxide concentrations. According to the global warming hypothesis, greenhouse gases from industry and agriculture have played a major role in the recently observed global warming.

[0008] Increased demand for energy by the global economy has also placed increasing pressure on the cost of hydrocarbons. Aside from energy, many industries, including plastics and chemical manufacturers, rely heavily on the availability of hydrocarbons as a feedstock for their manufacturing processes. Cost-effective alternatives to current sources of supply could help mitigate the upward pressure on energy and these raw material costs.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] In one aspect, the present invention is directed to The invention provides a microbe, which in various embodiments can comprise a microalgae cell, an oleaginous yeast, or a fungus containing an exogenous gene that encodes a protein selected from the group consisting of a lipase, sucrose transporter, sucrose invertase, fructokinase, polysaccharide-degrading enzyme, a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, a fatty acyl-CoA reductase, a fatty aldehyde reductase, a fatty aldehyde decarbonylase, and an acyl carrier protein (ACP). The microbe (e.g., microalgae cell) can, for example, be selected from Table 1. In particular embodiments, the cell is a species of the genus *Chlorella*, such as, e.g., *Chlorella fusca, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, Chlorella kessleri, Chlorella vulgaris, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana* or *Chlorella ellipsoidea*. In other embodiments, the microbe is an oleaginous yeast selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica*. In still other embodiments, the microbe is a fungus selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella*

alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum, a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium.* In other embodiments, the invention includes expression of hydrocarbon modification enzymes in bacterial hosts such as *E. Coli* and *Bacill*a method of producing renewable diesel. In one embodiment, the method comprises (a) culturing a population of microorganisms in the presence of a fixed carbon source, wherein (i) the microorganisms accumulate at least 10% of their dry cell weight as lipid, and (ii) the fixed carbon source is selected from the group consisting of glycerol, depolymerized cellulosic material, sucrose, molasses, glucose, arabinose, galactose, xylose, fructose, arabinose, mannose, acetate, and any combination of the foregoing, (b) isolating lipid components from the cultured microorganisms, and (c) subjecting the isolated lipid components to one or more chemical reactions to generate straight chain alkanes, whereby renewable diesel is produced.

[0010] In another aspect, the present invention is directed to a composition of liquid hydrocarbons made according to the method described directly above, wherein the composition conforms to the specifications of ASTM D975.

[0011] In another aspect, the present invention is directed to a method of producing jet fuel. In one embodiment, the method comprises (a) culturing a population of microorganisms in the presence of a fixed carbon source, wherein (i) the microorganisms accumulate at least 10% of their dry cell weight as lipid, and (ii) the fixed carbon source is selected from the group consisting of glycerol, depolymerized cellulosic material, sucrose, glucose, arabinose, galactose, xylose, fructose, arabinose, mannose, acetate, and any combination of the foregoing, (b) isolating lipid components from the cultured microorganisms, (c) subjecting the isolated lipid components to one or more chemical reactions to generate straight chain alkanes, (d) cracking the straight chain alkanes, whereby jet fuel is produced.

[0012] In another aspect, the present invention is directed to a composition of liquid hydrocarbons produced according to the method described directly above, wherein the composition conforms to the specifications of ASTM D1655.

[0013] In another aspect, the present invention is directed to a microalgae or yeast cell that has been genetically engineered and/or selected to express a lipid pathway enzyme at an altered level compared to a wild-type cell of the same species. In some cases, the cell

produces more lipid compared to the wild-type cell when both cells are grown under the same conditions. In some cases, the cell has been genetically engineered and/or selected to express a lipid pathway enzyme at a higher level than the wild-type cell. In some cases, the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of pyruvate dehydrogenase, acetyl-CoA carboxylase, acyl carrier protein, and glycerol-3 phosphate acyltransferase. In some cases, the cell has been genetically engineered and/or selected to express a lipid pathway enzyme at a lower level than the wild-type cell. In at least one embodiment in which the cell expresses the lipid pathway enzyme at a lower level, the lipid pathway enzyme comprises citrate synthase.

[0014] In some embodiments, the microalgae or yeast cell described above has been genetically engineered and/or selected to express a global regulator of fatty acid synthesis at an altered level compared to the wild-type cell, whereby the expression levels of a plurality of fatty acid synthetic genes are altered compared to the wild-type cell. In some cases, the lipid pathway enzyme comprises an enzyme that modifies a fatty acid. In some cases, the lipid pathway enzyme is selected from a stearoyl-ACP desaturase and a glycerolipid desaturase.

[0015] In another aspect, the present invention is directed to an oil-producing microbe containing one or more exogenous genes, wherein the exogenous genes encode protein(s) selected from the group consisting of a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA reductase, a fatty aldehyde reductase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, a fatty aldehyde decarbonylase, and an acyl carrier protein. In some cases, the microbe is *Chlorella protothecoides, Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea,* or *Chlorella sp.* In other cases, the microbe is another species as described herein. In one embodiment, the exogenous gene is in operable linkage with a promoter, which is inducible or repressible in response to a stimulus. In some cases, the stimulus is selected from the group consisting of an exogenously provided small molecule, heat, cold, and light. In some cases, the exogenous gene is expressed in a cellular compartment. In some embodiments, the cellular compartment is selected from the group consisting of a chloroplast and a mitochondrion.

[0016] In one embodiment, the exogenous gene encodes a fatty acid acyl-ACP thioesterase. In some cases, the thioesterase encoded by the exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from an acyl carrier protein (ACP). In some cases, the thioesterase encoded by the exogenous gene catalyzes the cleavage of a 10 to 14-carbon fatty acid from an

ACP. In one embodiment, the thioesterase encoded by the exogenous gene catalyzes the cleavage of a 12-carbon fatty acid from an ACP.

[0017] In one embodiment, the exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase. In some cases, the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of a 20 to 30-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol. In some cases, the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol. In some cases, the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of a 10 to 14-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol. In one embodiment, the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of a 12-carbon fatty acyl-CoA to dodecanol.

[0018] In one embodiment, the exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA reductase. In some cases, the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding aldehyde. In one embodiment, the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of a 12-carbon fatty acyl-CoA to dodecanal.

[0019] In at least one embodiment, the microbe of the invention further contains one or more exogenous sucrose utilization genes.

[0020] In another aspect, the present invention is directed to a microbe containing two exogenous genes, wherein a first exogenous gene encodes a fatty acyl-ACP thioesterase and a second exogenous gene encodes a protein selected from the group consisting of a fatty acyl-CoA reductase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, and an acyl carrier protein. In some cases, the microbe is *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides*. In other cases, the microbe is another species as described herein. In some cases, the two exogenous genes are each in operable linkage with a promoter, which is inducible in response to a stimulus. In some cases, each promoter is inducible in response to an identical stimulus.

[0021] In one embodiment, the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from an ACP. In some embodiments, the second exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase which catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol. In some cases, the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of a 10 to 14-carbon fatty acid from an ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes

the reduction of a 10 to 14-carbon fatty acyl-CoA to the corresponding primary alcohol, wherein the thioesterase and the reductase act on the same carbon chain length. In one embodiment, the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of a 12-carbon fatty acid from an ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of a 12-carbon fatty acyl-CoA to dodecanol. In some embodiments, the the second exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA reductase which catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding aldehyde.

[0022] In some embodiments, the second exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA reductase, and the microbe further contains a third exogenous gene encoding a fatty aldehyde decarbonylase. In some cases, the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from an ACP, the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding fatty aldehyde, and the decarbonylase encoded by the third exogenous gene catalyzes the conversion of an 8 to 18-carbon fatty aldehyde to a corresponding alkane, wherein the thioesterase, the reductase, and the decarbonylase act on the same carbon chain length.

[0023] In some embodiments, the second exogenous gene encodes an acyl carrier protein that is naturally co-expressed with the fatty acyl-ACP thioesterase.

[0024] In some embodiments, the second exogenous gene encodes an acyl carrier protein, and the microbe further contains a third exogenous gene encoding a protein selected from the group consisting of a fatty acyl-CoA reductase and a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase. In some cases, the third exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA reductase, and the microbe further contains a fourth exogenous gene encoding a fatty aldehyde decarbonylase.

[0025] In another aspect, the present invention is directed to a method of producing a molecule in a microbe population. In one embodiment, the method comprises culturing a population of microbes in a culture medium, wherein the microbes contain (i) a first exogenous gene encoding a fatty acyl-ACP thioesterase, and (ii) a second exogenous gene encoding a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, and the microbes synthesize a fatty acid linked to an acyl carrier protein (ACP), the fatty acyl-ACP thioesterase catalyzes the cleavage of the fatty acid from the ACP to yield, through further processing, a fatty acyl-CoA, and the fatty acyl-CoA/aldehyde reductase catalyzes the reduction of the acyl-CoA to an alcohol.

[0026] In one embodiment of the method of producing a molecule in a microbe population, the microbe is *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.* or *Chlorella protothecoides*. In other cases, the microbe is another species of microorganism as described herein. In some cases, the culture medium contains glycerol. In one embodiment, the glycerol is a byproduct of a transesterification process. In some cases, the culture medium contains glycerol and at least one other fixed carbon source. In one embodiment, the at least one other fixed carbon source is sucrose. In some cases, all of the glycerol and all of the at least one other fixed carbon source are provided to the microbes at the beginning of fermentation. In some cases, the glycerol and the at least one other fixed carbon source are fed to the microbes at a predetermined rate over the course of fermentation. In some culture methods of the invention, glycerol is provided to the microbes in the absence of the at least one other fixed carbon source for a first period of time, the at least one other fixed carbon source is provided at the end of the first period of time, and the microbes are cultured for a second period of time in the presence of the at least one other fixed carbon source.

[0027] In some embodiments, the exogenous genes are in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a first stimulus. In some cases, the method further comprises providing the first stimulus, and incubating the population of microbes for a first period of time in the presence of the first stimulus to produce an alcohol. In some cases, the method further comprises extracting the alcohol from aqueous biomass comprising the culture medium and the microbes.

[0028] In some embodiments, the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from the ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol, wherein the thioesterase and the reductase act on the same carbon chain length. In some cases, the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 10 to 14-carbon fatty acid from the ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 10 to 14-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol, wherein the thioesterase and the reductase act on the same carbon chain length. In one embodiment, the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of a 12-carbon fatty acid from the ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of a 12-carbon fatty acyl-CoA to dodecanol. In some cases, the microbes further contain a third

exogenous gene encoding an acyl carrier protein. In some embodiments, the third exogenous gene encodes an acyl carrier protein that is naturally co-expressed with the fatty acyl-ACP thioesterase.

[0029] In another aspect, the present invention is directed to a method of producing a lipid molecule in a microbe population. In one embodiment, the method comprises culturing a population of microbes in a culture medium, wherein the microbes contain (i) a first exogenous gene encoding a fatty acyl-ACP thioesterase, and (ii) a second exogenous gene encoding a fatty acyl-CoA reductase, and wherein the microbes synthesize a fatty acid linked to an acyl carrier protein (ACP), the fatty acyl-ACP thioesterase catalyzes the cleavage of the fatty acid from the ACP to yield, through further processing, a fatty acyl-CoA, and the fatty acyl-CoA reductase catalyzes the reduction of the acyl-CoA to an aldehyde. In some cases, the microbe is *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides*. In other cases, the microbe is another species of microorganism as described herein.

[0030] In some embodiments, the exogenous genes are in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a first stimulus, and the method further comprises providing the first stimulus, and incubating the population of microbes for a first period of time in the presence of the first stimulus to produce an aldehyde. In one embodiment, the method further comprises extracting the aldehyde from aqueous biomass comprising the culture medium and the population of microbes.

[0031] In some embodiments, the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from the ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding aldehyde, wherein the thioesterase and the reductase act on the same carbon chain length. In some cases, the microbes further contain a third exogenous gene encoding a fatty aldehyde decarbonylase that catalyzes the conversion of the aldehyde to an alkane.

[0032] In some cases, the exogenous genes are in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a first stimulus, and the method further comprises providing the first stimulus, and incubating the population of microbes for a first period of time in the presence of the first stimulus to produce an alkane. In some cases, the method further comprises

extracting the alkane from aqueous biomass comprising culture medium and the microbe population.

[0033] In some cases, the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from the ACP, the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding aldehyde, and the decarbonylase encoded by the third exogenous gene catalyzes the conversion of an 8 to 18-carbon aldehyde to a corresponding alkane, wherein the thioesterase, the reductase, and the decarbonylase act on the same carbon chain length. In some embodiments, the microbes further contain a third exogenous gene encoding an acyl carrier protein. In some cases, the third exogenous gene encodes an acyl carrier protein that is naturally co-expressed with the fatty acyl-ACP thioesterase. In some cases, the microbes further contain a fourth exogenous gene encoding a fatty aldehyde decarbonylase that catalyzes the conversion of the aldehyde to an alkane.

[0034] In some methods, the culture medium contains glycerol. In one embodiment, the glycerol is a byproduct of a transesterification process. In some cases, the culture medium contains glycerol and at least one other fixed carbon source. In one embodiment, the at least one other fixed carbon source is sucrose. In some cases, all of the glycerol and all of the at least one other fixed carbon source are provided to the microbes at the beginning of fermentation. In some cases, the glycerol and the at least one other fixed carbon source are fed to the microbes at a predetermined rate over the course of fermentation. In one embodiment, glycerol is provided to the microbes in the absence of the at least one other fixed carbon source for a first period of time, the at least one other fixed carbon source is provided at the end of the first period of time, and the microbes are cultured for a second period of time in the presence of the at least one other fixed carbon source.

[0035] In another aspect, the present invention is directed to a method of producing a fatty acid molecule having a specified carbon chain length in a microbe population. In one embodiment, the method comprises culturing a population of lipid-producing microbes in a culture medium, wherein the microbes contain an exogenous gene encoding a fatty acyl-ACP thioesterase having an activity specific to a carbon chain length, and wherein the microbes synthesize a fatty acid linked to an acyl carrier protein (ACP) and the thioesterase catalyzes the cleavage of the fatty acid from the ACP when the fatty acid has been synthesized to the specific carbon chain length. In some cases, the microbe is *Chlorella minutissima, Chlorella*

emersonii, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides*. In other cases, the microbe is another species of microorganism as described herein.

[0036] In some embodiments, the exogenous gene is in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a first stimulus, and the method further comprises providing the first stimulus, and incubating the population of microbes for a period of time in the presence of the first stimulus. In some cases, the method further comprises extracting the fatty acid from aqueous biomass comprising culture medium and the microbe population.

[0037] In some cases, the microbes further contain a second exogenous gene encoding an acyl carrier protein. In some embodiments, the second exogenous gene encodes an acyl carrier protein that is naturally co-expressed with the fatty acyl-ACP thioesterase. In one embodiment, the acyl-ACP thioesterase catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from the ACP.

[0038] In some cases, the culture medium contains glycerol. In one embodiment, the glycerol is a byproduct of a transesterification process. In some embodiments, the culture medium contains glycerol and at least one other fixed carbon source. In one embodiment, the at least one other carbon source is sucrose. In some cases, all of the glycerol and all of the at least one other fixed carbon source are provided to the microbes at the beginning of fermentation. In some cases, the glycerol and the at least one other fixed carbon source are fed to the microbes at a predetermined rate over the course of fermentation. In one embodiment, glycerol is provided to the microbes in the absence of the at least one other fixed carbon source for a first period of time, the at least one other fixed carbon source is provided at the end of the first period of time, and the microbes are cultured for a second period of time in the presence of the at least one other fixed carbon source.

[0039] In another aspect, the present invention is directed to a microalgae cell containing an exogenous gene, wherein the exogenous gene encodes a protein selected from the group consisting of a lipase, a sucrose transporter, a sucrose invertase, a fructokinase, or a polysaccharide-degrading enzyme. In some cases, the cell is *Chlorella minutissima*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides*. In other cases, the cell is another species of microalgae as described herein.

[0040] In some cases, the exogenous gene is in operable linkage with a promoter. In some cases, the promoter is inducible or repressible in response to a stimulus. In various

embodiments, the stimulus is selected from the group consisting of an exogenously provided small molecule, heat, cold, and light. In some cases, the exogenous gene is expressed in a cellular compartment. In some embodiments, the cellular compartment is selected from the group consisting of a chloroplast and a mitochondrion.

[0041] In some cases, the gene encodes a lipase that has at least 70% amino acid identity with a lipase selected from Table 9. In one embodiment, the lipase is novozym-435. In one embodiment, the polysaccharide-degrading enzyme is endogenous to a *Chlorella* virus.

[0042] In another aspect, the present invention is directed to a microalgae cell containing two exogenous genes, wherein a first exogenous gene encodes a lipase and a second exogenous gene encodes a polysaccharide-degrading enzyme. In some cases, the exogenous genes are each in operable linkage with a promoter. In some cases, the exogenous genes are each in operable linkage with promoters that are inducible in response to a stimulus. In some cases, the exogenous genes are each in operable linkage with promoters that are inducible in response to the same stimulus. In some cases, the exogenous genes are each in operable linkage with a promoter that is inducible in response to at least one stimulus that does not induce the other promoter.

[0043] In another aspect, the present invention is directed to a method of manufacturing a lipid molecule in a microbe. In one embodiment, the method comprises (a) culturing the microbe for a first period of time sufficient to increase the cell density, wherein the microbe contains (i) an exogenous gene encoding a lipase, and/or (ii) an exogenous gene encoding a polysaccharide-degrading enzyme,wherein the exogenous gene(s) are in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a stimulus, (b) providing the stimulus, and (c) incubating the microbe for a second period of time in the presence of the stimulus.

[0044] In another aspect, the present invention is directed to a method of manufacturing a lipid molecule in a microbe. In one embodiment, the method comprises (a) culturing a lipid-producing microbe for a first period of time sufficient to increase the cell density, (b) providing a virus capable of infecting and lysing the microbe when in direct contact with the microbe, and (c) incubating the microbe for a second period of time to produce lysed aqueous biomass. In one embodiment, the method further compries extracting lipid molecules from the lysed aqueous biomass.

[0045] In another aspect, the present invention is directed to a microalgae cell containing an exogenous gene, wherein the exogenous gene encodes a cofactor for a lipid pathway enzyme or encodes a protein that participates in the synthesis of the cofactor.

[0046] In another aspect, the present invention is directed to a method of culturing a lipid-producing microbe. In one embodiment, the method comprises culturing the microbe in the presence of a sufficient amount of one or more cofactor(s) for a lipid pathway enzyme to increase microbial lipid yield over microbial lipid yield in the absence of said one or more cofactors. In some cases, the one or more cofactors is a vitamin required by one or more lipid pathway enzymes. In one embodiment, the one or more cofactors is biotin. In some cases, the one or more cofactors is/are provided by including in the culture a microbe that has been genetically engineered to produce the one or more cofactors.

[0047] In another aspect, the present invention is directed to a method of fermenting a microorganism, which comprises providing a mixture comprising glucose and xylose as an energy source to the microorganism. In one embodiment, the mixture further comprises lignin. In one embodiment, the mixture further comprises at least one species of furfural. In some cases, the mixture is depolymerized cellulosic material. In some cases, the mixture further comprises as least one sucrose utilization enzyme. In one embodiment, the mixture comprises a sucrose invertase.

[0048] In some cases, the microorganism is selected from the group consisting of *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,* and *Pseudochlorella aquatica.* In other cases, the microorganism is another species of microorganism as described herein. In some cases, the microorganism has been genetically engineered to express an exogenous gene encoding at least one lipid modification enzyme, hydrocarbon modification enzyme, or sucrose utilization enzyme.

[0049] In another aspect, the present invention is directed to a method of culturing a microalgae, which comprises culturing the microalgae in a culture medium including a feedstock comprising at least one carbon substrate selected from the group consisting of a cellulosic material, a 5-carbon sugar, a 6-carbon sugar, and acetate. In some cases, the carbon substrate is glucose and the microalgae is of a genus selected from the group

consisting of *Chlorella, Parachlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus, Prototheca* and *Scenedesmus*. In some cases, the carbon substrate is xylose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella, Pseudochlorella,* and *Prototheca*. In some cases, the carbon substrate is sucrose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella,* and *Bracteococcus*. In some cases, the carbon substrate is fructose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella, Parachlorella, Prototheca,* and *Scenedesmus*. In some cases, the carbon substrate is arabinose and the microalgae is *Chlorella sp.* In some cases, the carbon substrate is mannose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella, Parachlorella, Bracteococcus, Prototheca,* and *Scenedesmus*. In some cases, the carbon substrate is galactose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Bracteococcus, Parachlorella, , Chlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus,* and *Prototheca*. In some cases, the carbon substrate is acetate and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella, Parachlorella,* and *Prototheca*.

[0050] In one embodiment, the culture medium further includes at least one sucrose utilization enzyme. In some cases, the microalgae has been genetically engineered to express an exogenous gene encoding at least one lipid modification enzyme, hydrocarbon modification enzyme, or sucrose utilization enzyme. In some cases, the culture medium includes a sucrose invertase.

[0051] In another aspect, the present invention is directed to a method of culturing microalgae comprising placing a plurality of microalgae cells in the presence of depolymerized cellulosic material. In some cases, the microalgae are cultured in the presence of an additional fixed carbon source selected from the group consisting of glycerol, sucrose, glucose, arabinose, galactose, xylose, fructose, arabinose, mannose, acetate, and any combination of the foregoing. In one embodiment, the microalgae are cultured in the presence of at least one sucrose utilization enzyme.

[0052] In some cases, the microalgae is selected from a species of the genus *Bracteococcus,* a species of the genus *Chlorella,* a species of the genus *Parachlorella,* a species of the genus *Prototheca,* or a species of the genus *Pseudochlorella*. In some cases, the microalgae is selected from *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, and *Pseudochlorella aquatica.* In other cases, the microalgae is another species of microalgae as described herein.

[0053] In some embodiments, the microalgae has been genetically engineered to express an exogenous gene encoding at least one lipid modification enzyme, hydrocarbon modification enzyme, or sucrose utilization enzyme. In one embodiment, the at least one sucrose utilization enzyme is a sucrose invertase. In some cases, the at least one lipid modification enzyme is selected from a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase. In some cases, the at least one hydrocarbon modification enzyme is selected from a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA reductase, a fatty aldehyde reductase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, a fatty aldehyde decarbonylase, and an acyl carrier protein.

[0054] In another aspect, the present invention is directed to a method of culturing a lipid-producing microbe, the method comprising culturing the microbe in the presence of acetic acid and the absence of a fixed nitrogen source. In some cases, the microbe is cultured in the presence of a sufficient amount of acetic acid to increase microbial lipid yield over microbial lipid yield in the absence of acetic acid, wherein culture conditions are otherwise the same between the two cultures.

[0055] In another aspect, the present invention is directed to a microbial culture containing a population of microorganisms and a culture medium comprising glucose, xylose, and a molecule selected from the group consisting of lignin and a species of furfural. In some cases, the microorganisms are selected from *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,* and *Pseudochlorella aquatica.* In other cases, the microorganisms are another species of microorganism as described herein.

[0056] In another aspect, the present invention is directed to a method of cultivating microalgae. In one embodiment, the method comprises (a) providing a microalgae cell capable of performing heterotrophic growth, (b) placing the microalgae cell in growth media, wherein the growth media comprises depolymerized cellulosic material, and (c) incubating the microalgae for a period of time sufficient to allow the cell to grow.

[0057] In another aspect, the present invention is directed to a method of biodiesel manufacturing. In one embodiment, the method comprises (a) culturing a lipid-producing microorganism in a first microbial culture, (b) recovering lipid from the biomass produced by the first microbial culture, (c) subjecting the lipid to transesterification to produce fatty acid ester(s) and glycerol, and (d) adding the glycerol to a second microbial culture. In some cases, the first and second microbial cultures are cultures of the same species of microorganism. In some cases, the second microbial culture comprises microorganisms selected from the group consisting of *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* and *Chlorella sorokiniana.* In other cases, the second microbial culture comprises another species of microorganism as described herein.

[0058] In another aspect, the present invention is directed to a method of fermentation comprising culturing a microorganism in the presence of glycerol and at least one other fixed carbon source. In some cases, the glycerol and the at least one other fixed carbon source are provided to the microorganism simultaneously at a predetermined ratio. In some cases, all of the glycerol and the at least one other fixed carbon source are provided to the microorganism at the beginning of the fermentation. In some cases, all of the glycerol and the at least one other fixed carbon source are fed to the microorganism at a predetermined rate over the course of the fermentation. In one embodiment of the method, glycerol is provided to the microorganism in the absence of the at least one other fixed carbon source for a first period of time, the at least one other fixed carbon source is provided at the end of the first period of time, and the microorganism is cultured for a second period of time in the presence of the at least one other fixed carbon source. In one embodiment, the at least one other fixed carbon source is fed to the microorganism at a predetermined rate during the second period of time. In some cases, all of the at least one other fixed carbon source is provided to the microorganism at the end of the first period of time. In one embodiment of the method, the at least one other fixed carbon source is provided to the microorganism in the absence of glycerol for a first period of time, glycerol is provided at the end of the first period of time, and the microorganism is cultured for a second period of time in the presence of glycerol. In one embodiment, the glycerol is a byproduct of a transesterification process. In one embodiment, the glycerol is acidulated. In another embodiment, the glycerol is non-acidulated. In some cases, the at least one other fixed carbon source is glucose. In some

cases, the at least one other fixed carbon source is depolymerized cellulosic material. In one embodiment, the at least one other fixed carbon source is sucrose.

[0059] In another aspect, the present invention is directed to a fermentor comprising a population of microorganisms, glycerol, and at least one sugar selected from the group consisting of xylose, glucose, and sucrose. In one embodiment, the glycerol is a byproduct of a lipid transesterification process. In some cases, the microorganisms are selected from the group consisting of *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* and *Chlorella sorokiniana.* In other cases, the microorganisms are another species as described herein.

[0060] In another aspect, the present invention is directed to a method of fermenting a microorganism. In one embodiment, the method comprises providing byproduct glycerol from a transesterification process as a sole source of fixed carbon energy. In one embodiment, no light energy is provided to the microorganism. In another embodiment, light energy is provided to the microorganism. In some cases, the microorganism is selected from *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* and *Chlorella sorokiniana.* In other cases, the microorganism is another species as described herein.

[0061] In another aspect, the present invention is directed to a microorganism containing an exogenous sucrose utilization gene. In one embodiment, the gene encodes a sucrose transporter. In one embodiment, the gene encodes a sucrose invertase. In one embodiment, the gene encodes a fructokinase. In some cases, the microorganism is a species selected from the group consisting of *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides.* In other cases, the microorganism is another species as described herein.

[0062] In another aspect, the present invention is directed to a cell of the species *Chlorella protothecoides, Chlorella emersonii, or Chlorella minutissima* wherein the cell contains an exogenous gene. In some cases, the exogenous gene encodes a protein selected from the group consisting of a sucrose transporter, a sucrose invertase, a lipid modification enzyme, a hydrocarbon modification enzyme and a fructokinase. In some embodiments, the protein is a sucrose invertase secreted into the extracellular space. In some embodiments, the protein is a sucrose invertase targeted to the cytoplasm.

[0063] In another aspect, the present invention is directed to a microbial culture containing a population of microorganisms, and a culture medium comprising (i) sucrose and (ii) a sucrose invertase enzyme.

[0064] In another aspect, the present invention is directed to a microbial culture containing a population of microorganisms, and a culture medium comprising (i) molasses and (ii) a sucrose invertase enzyme.

[0065] In another aspect, the present invention is directed to a microbial culture containing a population of microorganisms, and a culture medium comprising (i) sucrose, (ii) lignin, and (iii) a sucrose invertase enzyme.

[0066] In the various microbial cultures described above, the microorganisms contain at least one exogenous sucrose utilization gene. In some embodiments, the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase. In one embodiment, the sucrose invertase enzyme is a secrectable sucrose invertase enzyme encoded by an exogenous sucrose invertase gene expressed by the population of microorganisms. In some cases, the microorganisms contain at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme or a hydrocarbon modification enzyme.

[0067] In another aspect, the present invention is directed to a nucleic acid comprising a cDNA encoding a sucrose utilization gene, and a cDNA encoding a protein conferring resistance to the antibiotic hygromycin or the antibiotic G418.

[0068] In embodiments of the various methods, compositions, cells, microorganisms, microbes, microbial cultures, fermentors, and the like, described above, the microorganism or microbe can be a microalgae, an oleaginous yeast, a fungus, or a bacterium, unless otherwise specified. In some cases, the microorganism is selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1. In some cases, the microorganism is a species of the genus *Chlorella*. In some cases, the microorganism is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella*

protothecoides, 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, 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 xanthella, and *Chlorella zofingiensis*. In some cases, the microorganism is an oleaginous yeast selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica*. In some cases, the microorganism is a fungus selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

[0069] In the various embodiments described above, the microorganism can contain at least one exogenous sucrose utilization gene. In some cases, the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

[0070] In the various embodiments described above, the microorganism can contain at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme. In some cases, the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

[0071] In the various embodiments described above, the microorganism can contain at least one exogenous gene encoding a hydrocarbon modification enzyme. In some cases, the hydrocarbon modification enzyme is selected from the group consisting of a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, a fatty acyl-CoA reductase, a fatty aldehyde reductase, a fatty aldehyde decarbonylase, and/or an acyl carrier protein.

[0072] Any two or more of the various embodiments described above can be combined together to produce additional embodiments encompassed within the scope of the present invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0073] Figure 1 shows dry cell weight per liter of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with and without additional glucose.

[0074] Figure 2 shows dry cell weight per liter of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose.

[0075] Figure 3 shows relative lipid concentration of cultures of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose.

[0076] Figure 4 shows lipid concentration of cultures of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with and without additional glucose.

[0077] Figure 5 shows lipid as a percent of dry cell weight of two species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose, wherein glycerol is added sequentially after glucose.

[0078] Figure 6 shows lipid as a percent of dry cell weight of two species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose.

[0079] Figure 7 shows relative lipid concentration of cultures of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of 2% glucose and 1% glucose + 1% reagent grade glycerol.

[0080] Figure 8 shows lipid as a percent of dry cell weight of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of glucose with and without reagent grade glycerol, wherein glycerol is added sequentially or in combination with glucose.

[0081] Figure 9 shows relative lipid concentration of cultures of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose, wherein glycerol is added sequentially or in combination with glucose.

[0082] Figure 10 shows dry cell weight per liter of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose, wherein glycerol is added sequentially or in combination with glucose.

[0083] Figure 11(a) shows lipid as a percent of dry cell weight of *Spirulina platensis* when cultured in the presence of glucose, reagent grade glycerol, non-acidulated biodiesel byproduct glycerol, and a combination of glycerol and glucose.

[0084] Figure 11(b) shows lipid as a percent of dry cell weight of *Navicula pelliculosa* when cultured in the presence of various types of glycerol and in the presence of combinations of glycerol and glucose.

[0085] Figure 12(a) shows lipid as a percent of dry cell weight of *Scenedesmus armatus* when cultured in the presence of various types of glycerol and in the presence of a combination of glycerol and glucose.

[0086] Figure 12(b) shows dry cell weight per liter of *Scenedesmus armatus* when cultured in the presence of various types of glycerol and in the presence of a combination of biodiesel byproduct glycerol and glucose.

[0087] Figure 13 shows dry cell weight per liter of *Navicula pelliculosa* when cultured in the presence of various types of glycerol and in the presence of a combination of non-acidulated biodiesel byproduct glycerol and glucose.

[0088] Figure 14 shows dry cell weight per liter of *Scenedesmus armatus* and *Navicula pelliculosa* when cultured in the presence of acidulated and non-acidulated biodiesel byproduct glycerol with additional glucose, wherein glycerol is added sequentially or in combination with glucose.

[0089] Figure 15 shows a synergistic effect of a combination of xylose and glucose on growth of *Chlorella* compared to xylose or glucose alone.

[0090] Figure 16 shows genotyping of *Chlorella protothecoides* transformants containing an exogenous gene.

[0091] Figure 17 shows codon usage of *Chlorella protothecoides*.

[0092] Figure 18 shows codon usage of *D. salina* and *Chlorella pyrenoidosa*.

[0093] Figure 19 shows (a) reagent grade glycerol; (b) non-acidulated biodiesel byproduct glycerol; and (c) acidulated biodiesel byproduct glycerol, all of which were used in experiments described in the Examples.

[0094] Figure 20 shows growth of *Chlorella protothecoides* on glucose and fructose.

[0095] Figure 21 shows growth of *Chlorella fusca* on 1% sucrose.

[0096] Figure 22 shows growth of *Chlorella kessleri* on 1% sucrose.

[0097] Figure 23 shows dry cell weight per liter of *Chlorella protothecoides* when cultured in the presence of glucose, sucrose, or one of several molasses samples (designated BS1, BS2 and HTM) in the presence or absence of a sucrose invertase.

[0098] Figure 24 shows growth of *Chlorella protothecoides* when cultured in the presence of glucose, sucrose, or one of several molasses samples (designated BS1, BS2 and HTM) in the presence or absence of a sucrose invertase as measured by relative cell density.

[0099] Figure 25 shows an illustration of various plasmid constructs of yeast invertase (SUC2) with three different promoters (designated CMV, CV and HUP1) as well as restriction sites useful for subcloning.

[0100] Figure 26 shows genotyping of *Chlorella protothecoides* transformants selected on sucrose in the dark containing an exogenous sucrose invertase gene.

[0101] Figure 27 shows genotyping of *Chlorella protothecoides* cells transformed with a gene encoding a secreted sucrose invertase from *S. cerevisiae*.

[0102] Figure 28 shows genotyping of *Chlorella minutissima* and *Chlorella emersonii* cells transformed with a gene encoding a secreted sucrose invertase from *S. cerevisiae*.

[0103] Figure 29 illustrates a gas chromatograph generated by analysis of a renewable diesel product produced in accordance with the methods of the present invention, and described in Example 27.

[0104] Figure 30 illustrates a boiling point distribution plot for a renewable diesel product produced in accordance with the methods of the presence invention, and described in Example 27.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. DEFINITIONS

[0105] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the meaning commonly understood by a person skilled in the art to which this invention belongs. The following references provide one of skill with a general definition of many of the terms used in this invention: 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 Genetics*, 5th Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). As used herein, the following terms have the meanings ascribed to them unless specified otherwise.

[0106] As used with reference to a nucleic acid, "active in microalgae" refers to a nucleic acid that is functional in microalgae. For example, a promoter that has been used to drive an antibiotic resistance gene to impart antibiotic resistance to a transgenic microalgae is active in microalgae. Examples of promoters active in microalgae are promoters endogenous to certain algae species and promoters found in plant viruses.

[0107] An "acyl carrier protein" or "ACP" is a protein which binds a growing acyl chain during fatty acid synthesis as a thiol ester at the distal thiol of the 4'-phosphopantetheine moiety and comprises a component of the fatty acid synthase complex. The phrase "naturally co-expressed" with reference to an acyl carrier protein in conjunction with a fatty acyl-ACP thioesterase means that the ACP and the thioesterase are co-expressed naturally in a tissue or organism from which they are derived, e.g., because the genes encoding the two enzymes are under the control of a common regulatory sequence or because they are expressed in response to the same stimulus.

[0108] An "acyl-CoA molecule" or "acyl-CoA" is a molecule comprising an acyl moiety covalently attached to coenzyme A through a thiol ester linkage at the distal thiol of the 4'-phosphopantetheine moiety of coenzyme A.

[0109] "Axenic" means a culture of an organism that is free from contamination by other living organisms.

[0110] "Biodiesel" is a biologically produced fatty acid alkyl ester suitable for use as a fuel in a diesel engine.

[0111] The term "biomass" refers to material produced by growth and/or propagation of cells. Biomass may contain cells and/or intracellular contents as well as extracellular material. Extracellular material includes, but is not limited to, compounds secreted by a cell.

[0112] "Bioreactor" means an enclosure or partial enclosure in which cells are cultured, optionally in suspension.

[0113] As used herein, a "catalyst" refers to an agent, such as a molecule or macromolecular complex, capable of facilitating or promoting a chemical reaction of a reactant to a product without becoming a part of the product. A catalyst thus increases the rate of a reaction, after which, the catalyst may act on another reactant to form the product. A catalyst generally lowers the overall activation energy required for the reaction such that it proceeds more quickly or at a lower temperature. Thus a reaction equilibrium may be more quickly attained. Examples of catalysts include enzymes, which are biological catalysts, heat, which is a non-biological catalyst, and metal catalysts used in fossil oil refining processes.

[0114] "Cellulosic material" means the products of digestion of cellulose, including glucose and xylose, and optionally additional compounds such as disaccharides, oligosaccharides, lignin, furfurals and other compounds. Nonlimiting examples of sources of cellulosic material include sugar caner bagasses, sugar beet pulp, corn stover, wood chips, sawdust and switchgrass.

[0115] The term "co-culture", and variants thereof such as "co-cultivate", refer to the presence of two or more types of cells in the same bioreactor. The two or more types of cells may both be microorganisms, such as microalgae, or may be a microalgal cell cultured with a different cell type. The culture conditions may be those that foster growth and/or propagation of the two or more cell types or those that facilitate growth and/or proliferation of one, or a subset, of the two or more cells while maintaining cellular growth for the remainder.

[0116] The term "cofactor" is used herein to refer to any molecule, other than the substrate, that is required for an enzyme to carry out its enzymatic activity.

[0117] As used herein, "complementary DNA" ("cDNA") is a DNA representation of mRNA, usually obtained by reverse transcription of messenger RNA (mRNA) or amplification (e.g., via polymerase chain reaction ("PCR")).

[0118] The term "cultivated", and variants thereof, refer to the intentional fostering of growth (increases in cell size, cellular contents, and/or cellular activity) and/or propagation (increases in cell numbers via mitosis) of one or more cells by use of intended culture conditions. The combination of both growth and propagation may be termed proliferation. The one or more cells may be those of a microorganism, such as microalgae. Examples of intended conditions include the use of a defined medium (with known characteristics such as pH, ionic strength, and carbon source), specified temperature, oxygen tension, carbon dioxide levels, and growth in a bioreactor. The term does not refer to the growth or propagation of

microorganisms in nature or otherwise without direct human intervention, such as natural growth of an organism that ultimately becomes fossilized to produce geological crude oil.

[0119] As used herein, the term "cytolysis" refers to the lysis of cells in a hypotonic environment. Cytolysis is caused by excessive osmosis, or movement of water, towards the inside of a cell (hyperhydration). The cell cannot withstand the osmotic pressure of the water inside, and so it explodes.

[0120] As used herein, the terms "expression vector" or "expression construct" refer to a nucleic acid construct, generated recombinantly or synthetically, with a series of specified nucleic acid elements that permit transcription of a particular nucleic acid in a host cell. The expression vector can be part of a plasmid, virus, or nucleic acid fragment. Typically, the expression vector includes a nucleic acid to be transcribed operably linked to a promoter.

[0121] "Exogenous gene" refers to a nucleic acid transformed into a cell. A transformed cell may be referred to as a recombinant cell, into which additional exogenous gene(s) may be introduced. The exogenous gene may be from a different species (and so heterologous), or from the same species (and so homologous) relative to the cell being transformed. In the case of a homologous gene, it occupies a different location in the genome of the cell relative to the endogenous copy of the gene. The exogenous gene may be present in more than one copy in the cell. The exogenous gene may be maintained in a cell as an insertion into the genome or as an episomal molecule.

[0122] "Exogenously provided" describes a molecule provided to the culture media of a cell culture.

[0123] As used herein, a "fatty acyl-ACP thioesterase" is an enzyme that catalyzes the cleavage of a fatty acid from an acyl carrier protein (ACP) during lipid synthesis.

[0124] As used herein, a "fatty acyl-CoA/aldehyde reductase" is an enzyme that catalyzes the reduction of an acyl-CoA molecule to a primary alcohol.

[0125] As used herein, a "fatty acyl-CoA reductase" is an enzyme that catalyzes the reduction of an acyl-CoA molecule to an aldehyde.

[0126] As used herein, a "fatty aldehyde decarbonylase" is an enzyme that catalyzes the conversion of a fatty aldehyde to an alkane.

[0127] As used herein, a "fatty aldehyde reductase" is an enzyme that catalyzes the reduction of an aldehyde to a primary alcohol.

[0128] "Fixed carbon source" means molecule(s) containing carbon, preferably organic, that are present at ambient temperature and pressure in solid or liquid form.

[0129] "Fungus," as used herein, means heterotrophic organisms characterized by a chitinous cell wall from the kingdom of fungi.

[0130] "Homogenate" means biomass that has been physically disrupted.

[0131] As used herein, "hydrocarbon" refers to: (a) a molecule containing only hydrogen and carbon atoms wherein the carbon atoms are covalently linked to form a linear, branched, cyclic, or partially cyclic backbone to which the hydrogen atoms are attached; or (b) a molecule that only primarily contains hydrogen and carbon atoms and that can be converted to contain only hydrogen and carbon atoms by one to four chemical reactions. Nonlimiting examples of the latter include hydrocarbons containing an oxygen atom between one carbon and one hydrogen atom to form an alcohol molecule, as well as aldehydes containing a single oxygen atom. Methods for the reduction of alcohols to hydrocarbons containing only carbon and hydrogen atoms are well known. Another example of a hydrocarbon is an ester, in which an organic group replaces a hydrogen atom (or more than one) in an oxygen acid. The molecular structure of hydrocarbon compounds varies from the simplest, in the form of methane (CH_4), which is a constituent of natural gas, to the very heavy and very complex, such as some molecules such as asphaltenes found in crude oil, petroleum, and bitumens. Hydrocarbons may be in gaseous, liquid, or solid form, or any combination of these forms, and may have one or more double or triple bonds between adjacent carbon atoms in the backbone. Accordingly, the term includes linear, branched, cyclic, or partially cyclic alkanes, alkenes, lipids, and paraffin. Examples include propane, butane, pentane, hexane, octane, triolein, and squalene.

[0132] "Hydrocarbon modification enzyme" refers to an enzyme that alters the covalent structure of a hydrocarbon. Examples of hydrocarbon modification enzymes include a lipase, a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, a fatty acyl-CoA reductase, a fatty aldehyde reductase, and a fatty aldehyde decarbonylase. Compounds produced by the enzymatic activity of hydrocarbon modification enzymes, including fatty acids, alcohols, aldehydes, alkanes, or other compounds derived therefrom are referred to herein interchangeably as hydrocarbons or lipids.

[0133] The term "hydrogen:carbon ratio" refers to the ratio of hydrogen atoms to carbon atoms in a molecule on an atom-to-atom basis. The ratio may be used to refer to the number of carbon and hydrogen atoms in a hydrocarbon molecule. For example, the hydrocarbon with the highest ratio is methane CH_4 (4:1).

[0134] "Hydrophobic fraction" refers to the portion, or fraction, of a material that is more soluble in a hydrophobic phase in comparison to an aqueous phase. A hydrophobic fraction is substantially insoluble in water and usually non-polar.

[0135] As used herein, the phrase "increase lipid yield" refers to an increase in the productivity of a microbial culture by, for example, increasing dry weight of cells per liter of culture, increasing the percentage of cells that constitute lipid, or increasing the overall amount of lipid per liter of culture volume per unit time.

[0136] An "inducible promoter" is one that mediates transcription of an operably linked gene in response to a particular stimulus.

[0137] As used herein, the phrase "in operable linkage" refers to a functional linkage between two sequences, such a control sequence (typically a promoter) and the linked sequence. A promoter is in operable linkage with an exogenous gene if it can mediate transcription of the gene.

[0138] The term "in situ" means "in place" or "in its original position". For example, a culture may contain a first microalgae secreting a catalyst and a second microorganism secreting a substrate, wherein the first and second cell types produce the components necessary for a particular chemical reaction to occur in situ in the co-culture without requiring further separation or processing of the materials.

[0139] A "limiting concentration of a nutrient" is a concentration in a culture that limits the propagation of a cultured organism. A "non-limiting concentration of a nutrient" is a concentration that supports maximal propagation during a given culture period. Thus, the number of cells produced during a given culture period is lower in the presence of a limiting concentration of a nutrient than when the nutrient is non-limiting. A nutrient is said to be "in excess" in a culture, when the nutrient is present at a concentration greater than that which supports maximal propagation.

[0140] As used herein, a "lipase" is a water-soluble enzyme that catalyzes the hydrolysis of ester bonds in water-insoluble, lipid substrates. Lipases catalyze the hydrolysis of lipids into glycerols and fatty acids.

[0141] As used herein, a "lipid pathway enzyme" is any enzyme that plays a role in lipid metabolism, i.e., either lipid synthesis, modification, or degradation. This term encompasses proteins that chemically modify lipids, as well as carrier proteins.

[0142] "Lipids" are a class of hydrocarbon that are soluble in nonpolar solvents (such as ether and chloroform) and are relatively or completely insoluble in water. Lipid molecules have these properties because they consist largely of long hydrocarbon tails which are hydrophobic in nature. Examples of lipids include fatty acids (saturated and unsaturated); glycerides or glycerolipids (such as monoglycerides, diglycerides, triglycerides or neutral fats, and phosphoglycerides or glycerophospholipids); nonglycerides (sphingolipids, sterol lipids including cholesterol and steroid hormones, prenol lipids including terpenoids, fatty alcohols, waxes, and polyketides); and complex lipid derivatives (sugar-linked lipids, or glycolipids, and protein-linked lipids). "Fats" are a subgroup of lipids called "triacylglycerides."

[0143] As used herein, the term "lysate" refers to a solution containing the contents of lysed cells.

[0144] As used herein, the term "lysis" refers to the breakage of the plasma membrane and optionally the cell wall of a biological organism sufficient to release at least some intracellular content, often by mechanical, viral or osmotic mechanisms that compromise its integrity.

[0145] As used herein, the term "lysing" refers to disrupting the cellular membrane and optionally the cell wall of a biological organism or cell sufficient to release at least some intracellular content.

[0146] "Microalgae" means a eukarytotic microbial organism that contains a chloroplast, and optionally that is capable of performing photosynthesis, or a prokaryotic microbial organism capable of performing photosynthesis. Microalgae include obligate photoautotrophs, which cannot metabolize a fixed carbon source as energy, as well as heterotrophs, which can live solely off of a fixed carbon source. Microalgae can refer to unicellular organisms that separate from sister cells shortly after cell division, such as

Chlamydomonas, and can also refer to microbes such as, for example, *Volvox*, which is a simple multicellular photosynthetic microbe of two distinct cell types. "Microalgae" can also refer to cells such as *Chlorella* and *Dunaliella*. "Microalgae" also includes other microbial photosynthetic organisms that exhibit cell-cell adhesion, such as *Agmenellum, Anabaena*, and *Pyrobotrys*. "Microalgae" also includes obligate heterotrophic microorganisms that have lost the ability to perform photosynthesis, such as certain dinoflagellate algae species.

[0147] The terms "microorganism" and "microbe" are used interchangeably herein to refer to microscopic unicellular organisms.

[0148] "Oleaginous yeast," as used herein, means yeast that can naturally accumulate more than 10% of its dry cell weight as lipid or can do so as a result of genetic engineering. Oleaginous yeast includes organisms such as *Yarrowia lipolytica*, as well as engineered strains of yeast such as *Saccharomyces cerevisiae* that have been engineered to accumulate more than 10% of their dry cell weight as lipid.

[0149] As used herein, the term "osmotic shock" refers to the rupture of cells in a solution following a sudden reduction in osmotic pressure. Osmotic shock is sometimes induced to release cellular components of such cells into a solution.

[0150] "Photobioreactor" refers to a container, at least part of which is at least partially transparent or partially open, thereby allowing light to pass through, in which one or more microalgae cells are cultured. Photobioreactors may be closed, as in the instance of a polyethylene bag or Erlenmeyer flask, or may be open to the environment, as in the instance of an outdoor pond.

[0151] As used herein, a "polysaccharide-degrading enzyme" refers to any enzyme capable of catalyzing the hydrolysis, or depolymerization, of any polysaccharide. For example, cellulases catalyze the hydrolysis of cellulose.

[0152] "Polysaccharides" (also called "glycans") are carbohydrates made up of monosaccharides joined together by glycosidic linkages. Cellulose is an example of a polysaccharide that makes up certain plant cell walls. Cellulose can be depolymerized by enzymes to yield monosaccharides such as xylose and glucose, as well as larger disaccharides and oligosaccharides.

[0153] "Port", in the context of a bioreactor, refers to an opening in the bioreactor that allows influx or efflux of materials such as gases, liquids, and cells. Ports are usually connected to tubing leading from the photobioreactor.

[0154] A "promoter" is defined as an array of nucleic acid control sequences that direct transcription of a nucleic acid. As used herein, a promoter includes necessary nucleic acid sequences near the start site of transcription, such as, in the case of a polymerase II type promoter, a TATA element. A promoter also optionally includes distal enhancer or repressor elements, which can be located as much as several thousand base pairs from the start site of transcription.

[0155] As used herein, the term "recombinant" when used with reference, e.g., to a cell, or nucleic acid, protein, or vector, indicates that the cell, nucleic acid, protein or vector, has been modified by the introduction of an exogenous nucleic acid or protein or the alteration of a native nucleic acid or protein, or that the cell is derived from a cell so modified. Thus, e.g., recombinant cells express genes that are not found within the native (non-recombinant) form of the cell or express native genes that are otherwise abnormally expressed, under expressed or not expressed at all. By the term "recombinant nucleic acid" herein is meant nucleic acid, originally formed in vitro, in general, by the manipulation of nucleic acid, e.g., using polymerases and endonucleases, in a form not normally found in nature. In this manner, operably linkage of different sequences is achieved. Thus an isolated nucleic acid, in a linear form, or an expression vector formed in vitro by ligating DNA molecules that are not normally joined, are both considered recombinant for the purposes of this invention. It is understood that once a recombinant nucleic acid is made and reintroduced into a host cell or organism, it will replicate non-recombinantly, i.e., using the in vivo cellular machinery of the host cell rather than in vitro manipulations; however, such nucleic acids, once produced recombinantly, although subsequently replicated non-recombinantly, are still considered recombinant for the purposes of the invention. Similarly, a "recombinant protein" is a protein made using recombinant techniques, i.e., through the expression of a recombinant nucleic acid as depicted above.

[0156] As used herein, the term "renewable diesel" refers to alkanes (such as C:10:0, C12:0, C:14:0, C16:0 and C18:0) produced through hydrogenation and deoxygenation of lipids.

[0157] As used herein, the term "sonication" refers to a process of disrupting biological materials, such as a cell, by use of sound wave energy.

[0158] "Species of furfural" refers to 2-Furancarboxaldehyde or a derivative thereof which retains the same basic structural characteristics.

[0159] As used herein, "stover" refers to the dried stalks and leaves of a crop remaining after a grain has been harvested.

[0160] A "sucrose utilization gene" is a gene that, when expressed, aids the ability of a cell to utilize sucrose as an energy source. Proteins encoded by a sucrose utilization gene are referred to herein as "sucrose utilization enzymes" and include sucrose transporters, sucrose invertases, and hexokinases such as glucokinases and fructokinases.

[0161] "Wastewater" is watery waste which typically contains washing water, laundry waste, faeces, urine and other liquid or semi-liquid wastes. It includes some forms of municipal waste as well as secondarily treated sewage.

[0162] For sequence comparison to determine percent nucleotide or amino acid identity, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are input into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identity for the test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the designated program parameters.

[0163] Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by visual inspection (see generally Ausubel *et al., supra*).

[0164] Another example algorithm that is suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity is the BLAST algorithm, which is described in Altschul *et al., J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (at the web address

www.ncbi.nlm.nih.gov). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul *et al.*, *supra.*). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are then extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always > 0) and N (penalty score for mismatching residues; always < 0). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. For identifying whether a nucleic acid or polypeptide is within the scope of the invention, the default parameters of the BLAST programs are suitable. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a word length (W) of 11, an expectation (E) of 10, M=5, N=-4, and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a word length (W) of 3, an expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix. The TBLATN program (using protein sequence for nucleotide sequence) uses as defaults a word length (W) of 3, an expectation (E) of 10, and a BLOSUM 62 scoring matrix. (see Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

[0165] In addition to calculating percent sequence identity, the BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, *e.g.*, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.1, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

II. GENERAL

[0166] The invention is premised in part on the insight that certain microorganisms can be used to produce oils, fuels, and other hydrocarbon or lipid compositions economically and in large quantities for use in the transportation fuel, petrochemical industry, and/or food and cosmetic industries, among other applications. Suitable microorganisms include microalgae, oleaginous yeast, and fungi. A preferred genus of microalgae for use in the invention is the lipid-producing microalgae *Chlorella*. Transesterification of lipids yields long-chain fatty acid esters useful as biodiesel. Other enzymatic and chemical processes can be tailored to yield fatty acids, aldehydes, alcohols, alkanes, and alkenes. The present application describes methods for genetic modification of multiple species and strains of microorganisms, including *Chlorella* and similar microbes to provide organisms having characteristics that facilitate the production of lipid suitable for conversion into oils, fuels, and oleochemicals. In some applications, renewable diesel, jet fuel, or other hydrocarbon compounds are produced. The present application also describes methods of cultivating microalgae for increased productivity and increased lipid yield, and/or for more cost-effective production of the compositions described herein.

[0167] In particular embodiments, the present application describes genetically engineering strains of microalgae with one or more exogenous genes. For example, microalgae that produce high levels of triacylglycerides (TAGs) suitable for biodiesel can be engineered to express a lipase, which can facilitate transesterification of microalgal TAGs. The lipase can optionally be expressed using an inducible promoter, so that the cells can first be grown to a desirable density in a fermentor and then harvested, followed by induction of the promoter to express the lipase, optionally in the presence of sufficient alcohol to drive conversion of TAGs to fatty acid esters.

[0168] Some microalgal lipid is sequestered in cell membranes and other non-aqueous parts of the cell. Therefore, to increase the yield of the transesterification reaction, it can be beneficial to lyse the cells to increase the accessibility of the lipase to the lipid. Cell disruption can be performed, for example, mechanically, through addition of pressurized steam, or by employing a virus that lyses the microalgae cells, expressing a gene to produce a lytic protein in the cell, or treating the culture with an agent that lyses microalgae cells. Steam treatment of microalgae for cell disruption is described, for example, in U.S. Patent 6,750,048.

[0169] Also disclosed herein is the genetic engineering of microalgae that produce high levels of TAGs to express a gene that lyses microalgae cells, such as for example, a gene from a lytic virus. This gene can be expressed using an inducible promoter, so that the cells can first be grown to a desirable density in a fermentor and then harvested, followed by induction of the promoter to express the gene to lyse the cells. A gene encoding a polysaccharide-degrading enzyme, for example, can be expressed to lyse the cells.

[0170] Optionally, the lipase can be expressed in an intracellular compartment, where it remains separate from the majority of the microalgal lipid until transesterification. Generally, it is preferable to carry out transesterification after water has been substantially removed from the preparation and/or an excess of alcohol has been added. Lipases can use water, as well as alcohol, as a substrate in transesterification. With water, the lipid is conjugated to a hydroxyl moiety to produce a polar fatty acid, rather than an ester. With an alcohol, such as methanol, the lipid is conjugated to a methyl group, producing a non-polar fatty acid ester, which is typically preferable for a transportation fuel. To limit exposure of the lipase to microalgal lipid until conditions are suitable for transesterification to produce fatty acid esters, the lipase can be expressed, for example, in the chloroplast, mitochondria, or other cellular organelle. This compartmentalized expression results in sequestration of the lipase from the majority of the cellular lipid until after the cells have been disrupted.

[0171] In other particular embodiments, the present application describes genetically engineering strains of microalgae, oleaginous yeast, bacteria, or fungi with one or more exogenous genes to produce various hydrocarbon compounds. For example, microalgae that would naturally, or through genetic modification, produce high levels of lipids can be engineered (or further engineered) to express an exogenous fatty acyl-ACP thioesterase, which can facilitate the cleavage of fatty acids from the acyl carrier protein (ACP) during lipid synthesis. These fatty acids can be recovered or, through further enzymatic processing within the cell, yield other hydrocarbon compounds. Optionally, the fatty acyl-ACP thioesterase can be expressed from a gene operably linked to an inducible promoter, and/or can be expressed in an intracellular compartment.

[0172] The fatty acyl-ACP thioesterase can be chosen based on its specificity for a growing (during fatty acid synthesis) fatty acid having a particular carbon chain length. For example, the fatty acyl-ACP thioesterase can have a specificity for a carbon chain length ranging from

8 to 34 carbon atoms, preferably from 8 to 18 carbon atoms, and more preferably from 10 to 14 carbon atoms. A specificity for a fatty acid with 12 carbon atoms is most preferred.

[0173] Further, the invention provides genetically engineered strains of microalgae to express two or more exogenous genes, such as, for example, a lipase and a lytic gene, e.g., one encoding a polysaccharide-degrading enzyme. One or both genes can be expressed using an inducible promoter, which allows the relative timing of expression of these genes to be controlled to enhance the lipid yield and conversion to fatty acid esters. The invention also provides vectors and methods for engineering lipid-producing microbes to metabolize sucrose, which is an advantageous trait because it allows the engineered cells to convert sugar cane or other feedstocks into lipids appropriate for production of oils, fuels, oleochemicals and the like.

[0174] In other embodiments, the invention provides genetically engineered strains of microbes (e.g., microalgae, oleaginous yeast, bacteria, or fungi) that express two or more exogenous genes, such as, for example, a fatty acyl-ACP thioesterase and a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, the combined action of which yields an alcohol product. The invention further provides other combinations of exogenous genes, including without limitation, a fatty acyl-ACP thioesterase and a naturally co-expressed acyl carrier protein to generate length-specific fatty acids, or a fatty acyl-ACP thioesterase and a fatty acyl-CoA reductase to generate aldehydes. The invention also provides for the combination of a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA reductase, and a fatty aldehyde decarbonylase to generate alkanes or alkenes. One or more of the exogenous genes can be expressed using an inducible promoter.

[0175] The invention provides further modifications of microalgae, for example to provide microalgae with desired growth characteristics and/or to enhance the amount and/or quality of lipids produced. For example, microalgae can be engineered to increase carbon flux into the lipid pathway and/or modify the lipid pathway to beneficially alter the proportions or properties of lipid produced by the cells.

[0176] This application discloses genetically engineering strains of microalgae to express two or more exogenous genes, one encoding a transporter of a fixed carbon source (such as sucrose) and a second encoding a sucrose invertase enzyme. The resulting fermentable organisms produce hydrocarbons at lower manufacturing cost than what has been obtainable by previously known methods of biological hydrocarbon production. The insertion of the

two exogenous genes described above can be combined with the disruption of polysaccharide biosynthesis through directed and/or random mutagenesis, which steers ever greater carbon flux into hydrocarbon production. Individually and in combination, trophic conversion, engineering to alter hydrocarbon production and treatment with exogenous enzymes alter the hydrocarbon composition produced by a microorganism. The alteration can be a change in the amount of hydrocarbons produced, the amount of one or more hydrocarbon species produced relative to other hydrocarbons, and/or the types of hydrocarbon species produced in the microorganism. For example, microalgae can be engineered to produce a higher amount and/or percentage of TAGs.

III. OIL- OR LIPID-PRODUCING MICROORGANISMS

[0177] Any species of organism that produces suitable lipid or hydrocarbon can be used, although microorganisms that naturally produce high levels of suitable lipid or hydrocarbon are preferred. Production of hydrocarbons by microorganisms is reviewed by Metzger et al. Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66: 486–496 and A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann and Paul Roessler (1998).

[0178] Considerations affecting the selection of microorganisms for use in the invention include, in addition to production of suitable lipids or hydrocarbons for production of oils, fuels, and oleochemicals: (1) high lipid content as a percentage of cell weight; (2) ease of growth; (3) ease of genetic engineering; and (4) ease of biomass processing. In particular embodiments, the wild-type or genetically engineered microorganism yields cells that are at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, or at least 70% or more lipid. Preferred organisms grow heterotrophically (on sugars in the absence of light) or can be engineered to do so using, for example, methods disclosed herein. The ease of transformation and availability of selectable markers and promoters, constitutive and/or inducible, that are functional in the microorganism affect the ease of genetic engineering. Processing considerations can include, for example, the availability of effective means for lysing the cells.

A. Algae

[0179] In one embodiment of the present invention, the microorganism is a microalgae. Nonlimiting examples of microalgae that can be used in accordance with the present invention can be found in Table 1.

[0180] Table 1. Examples of microalgae.

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, and *Viridiella fridericiana*

1. *Chlorella*

[0181] In a preferred embodiment of the present invention, the microorganism is of the genus *Chlorella,* preferably, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella minutissima*, or *Chlorella emersonii.*

[0182] *Chlorella* is a genus of single-celled green algae, belonging to the phylum Chlorophyta. It is spherical in shape, about 2 to 10 μm in diameter, and is without flagella. Some species of *Chlorella* are naturally heterotrophic.

[0183] *Chlorella*, particularly *Chlorella protothecoides*, is a preferred microorganism for use in the invention because of its high composition of lipid, particularly long-chain lipid suitable for biodiesel. In addition, this microalgae grows heterotrophically and can be genetically engineered as demonstrated in the Examples herein.

[0184] In a preferred embodiment of the present invention, the microorganism used for expression of a transgene is of the genus *Chlorella,* preferably, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima*, or *Chlorella emersonii.* Examples of expression of transgenes in, e.g., *Chlorella*, can be found in the literature (see for example *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)). Also see Examples herein. Other lipid-producing microalgae can be engineered as well, including prokaryotic Microalgae (see Kalscheuer st al., Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 52, Number 4 / October, 1999).

2. Identification of *Chlorella* Species

[0185] Species of *Chlorella* for use in the invention can be identified by amplification of certain target regions of the genome. For example, identification of a specific *Chlorella* species or strain can be achieved through amplification and sequencing of nuclear and/or chloroplast DNA using primers and methodology using any region of the genome, for example using the methods described in Wu *et al.*, *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2001) 42:115-121 Identification of *Chlorella spp.* isolates using ribosomal DNA sequences. Well established methods of phylogenetic analysis, such as amplification and sequencing of ribosomal internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2 rDNA), 18S rRNA, and other conserved genomic regions can be used by those skilled in the art to identify species of not only *Chlorella*, but other hydrocarbon and lipid producing organisms capable of using the methods disclosed herein. For examples of methods of identification and classification of algae also see for example *Genetics*, 2005 Aug;170(4):1601-10 and *RNA*, 2005 Apr;11(4):361-4.

B. Oleaginous Yeast

[0186] In one embodiment of the present invention, the microorganism is an oleaginous yeast. Nonlimiting examples of oleaginous yeast that can be used in accordance with the present invention can be found in Table 2.

[0187] Table 2. Examples of oleaginous yeast.

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

C. Other Fungi

[0188] In one embodiment of the present invention, the microorganism is a fungus. Nonlimiting examples of fungi that can be used in accordance with the present invention can be found in Table 3.

[0189] Table 3. Examples of fungi.

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

D. Bacteria

[0190] In one embodiment of the present invention, the microorganism is a bacterium.

[0191] Examples of expression of exogenous genes in bacteria, such as *E. coli,* are well known; see for example *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.* (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press).

IV. METHODS OF CULTURING MICROORGANISMS

[0192] Microrganisms are cultured both for purposes of conducting genetic manipulations and for subsequent production of hydrocarbons (e.g., lipids, fatty acids, aldehydes, alcohols, and alkanes). The former type of culture is conducted on a small scale and initially, at least, under conditions in which the starting microorganism can grow. For example, if the starting microorganism is a photoautotroph the initial culture is conducted in the presence of light. The culture conditions can be changed if the microorganism is evolved or engineered to grow independently of light. Culture for purposes of hydrocarbon production is usually conducted on a large scale. Preferably a fixed carbon source is present. The culture can also be exposed to light some or all of the time.

[0193] Microalgae can be cultured in liquid media. The culture can be contained within a bioreactor. Optionally, the bioreactor does not allow light to enter. Alternatively, microalgae can also be cultured in photobioreactors that contain a fixed carbon source and allow light to strike the cells. Exposure of microalgae cells to light, even in the presence of a fixed carbon source that the cells transport and utilize (i.e., mixotrophic growth), nonetheless accelerates growth compared to culturing cells in the dark. Culture condition parameters can be manipulated to optimize total hydrocarbon production, the combination of hydrocarbon

species produced, and/or production of a hydrocarbon species. In some instances it is preferable to culture cells in the dark, such as, for example, when using extremely large (40,000 liter and higher) fermentors that do not allow light to strike the culture.

[0194] Microalgal culture media typically contains components such as a fixed nitrogen source, trace elements, optionally a buffer for pH maintenance, and phosphate. Other components can include a fixed carbon source such as acetate or glucose, and salts such as sodium chloride, particularly for seawater microalgae. Examples of trace elements include zinc, boron, cobalt, copper, manganese, and molybdenum in, for example, the respective forms of $ZnCl_2$, H_3BO_3, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ and $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$.

[0195] For organisms able to grow on a fixed carbon source, the fixed carbon source can be, for example, glucose, fructose, sucrose, galactose, xylose, mannose, rhamnose, N-acetylglucosamine, glycerol, floridoside, and/or glucuronic acid. The one or more carbon source(s) can be supplied at a concentration of at least about 50 μM, at least about 100 μM, at least about 500 μM, at least about 5 mM, at least about 50 mM, and at least about 500 mM, of one or more exogenously provided fixed carbon source(s). Some microalgae species can grow by utilizing a fixed carbon source such as glucose or acetate in the absence of light. Such growth is known as heterotrophic growth. For *Chlorella protothecoides*, for example, heterotrophic growth results in high production of biomass and accumulation of high lipid content in cells.

[0196] Some microorganisms naturally grow on or can be engineered to grow on a fixed carbon source that is a heterogeneous source of compounds such as municipal waste, secondarily treated sewage, wastewater, and other sources of fixed carbon and other nutrients such as sulfates, phosphates, and nitrates. The sewage component serves as a nutrient source in the production of hydrocarbons, and the culture provides an inexpensive source of hydrocarbons.

[0197] Other culture parameters can also be manipulated, such as the pH of the culture media, the identity and concentration of trace elements and other media constituents.

A. Photosynthetic Growth

[0198] Microalgae can be grown in the presence of light. The number of photons striking a culture of microalgae cells can be manipulated, as well as other parameters such as the wavelength spectrum and ratio of dark:light hours per day. Microalgae can also be cultured

in natural light, as well as simultaneous and/or alternating combinations of natural light and artificial light. For example, microalgae of the genus *Chlorella* can be cultured under natural light during daylight hours and under artificial light during night hours.

[0199] The gas content of a photobioreactor to grow microorganisms like microalgae can be manipulated. Part of the volume of a photobioreactor can contain gas rather than liquid. Gas inlets can be used to pump gases into the photobioreactor. Any gas can be pumped into a photobioreactor, including air, air/CO_2 mixtures, noble gases such as argon and others. The rate of entry of gas into a photobioreactor can also be manipulated. Increasing gas flow into a photobioreactor increases the turbidity of a culture of microalgae. Placement of ports conveying gases into a photobioreactor can also affect the turbidity of a culture at a given gas flow rate. Air/CO_2 mixtures can be modulated to generate optimal amounts of CO_2 for maximal growth by a particular organism. Microalgae grow significantly faster in the light under, for example, 3% CO_2/97% air than in 100% air. 3% CO_2/97% air is approximately 100-fold more CO_2 than found in air. For example, air:CO_2 mixtures of about 99.75% air:0.25% CO_2, about 99.5% air:0.5% CO_2, about 99.0% air:1.00% CO_2, about 98.0% air:2.0% CO_2, about 97.0% air:3.0% CO_2, about 96.0% air:4.0% CO_2, and about 95.00% air:5.0% CO_2 can be infused into a bioreactor or photobioreactor.

[0200] Microalgae cultures can also be subjected to mixing using devices such as spinning blades and impellers, rocking of a culture, stir bars, infusion of pressurized gas, and other instruments.

[0201] Photobioreactors can have ports allowing entry of gases, solids, semisolids and liquids into the chamber containing the microalgae. Ports are usually attached to tubing or other means of conveying substances. Gas ports, for example, convey gases into the culture. Pumping gases into a photobioreactor can serve to both feed cells CO_2 and other gases and to aerate the culture and therefore generate turbidity. The amount of turbidity of a culture varies as the number and position of gas ports is altered. For example, gas ports can be placed along the bottom of a cylindrical polyethylene bag. Microalgae grow faster when CO_2 is added to air and bubbled into a photobioreactor. For example, a 5% CO_2:95% air mixture is infused into a photobioreactor containing *Botryococcus* cells (see for example J Agric Food Chem. 2006 Jun 28;54(13):4593-9; J Biosci Bioeng. 1999;87(6):811-5; and J Nat Prod. 2003 Jun;66(6):772-8).

[0202] Photobioreactors can be exposed to one or more light sources to provide microalgae with light as an energy source via light directed to a surface of the photobioreactor. Preferably the light source provides an intensity that is sufficient for the cells to grow, but not so intense as to cause oxidative damage or cause a photoinhibitive response. In some instances a light source has a wavelength range that mimics or approximately mimics the range of the sun. In other instances a different wavelength range is used. Photobioreactors can be placed outdoors or in a greenhouse or other facility that allows sunlight to strike the surface. Preferred photon intensities for species of the genus *Botryococcus* are between 25 and 500 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ (see for example Photosynth Res. 2005 Jun;84(1-3):21-7).

[0203] Photobioreactors preferably have one or more ports that allow media entry. It is not necessary that only one substance enter or leave a port. For example, a port can be used to flow culture media into the photobioreactor and then later can be used for sampling, gas entry, gas exit, or other purposes. In some instances a photobioreactor is filled with culture media at the beginning of a culture and no more growth media is infused after the culture is inoculated. In other words, the microalgal biomass is cultured in an aqueous medium for a period of time during which the microalgae reproduce and increase in number; however quantities of aqueous culture medium are not flowed through the photobioreactor throughout the time period. Thus in some embodiments, aqueous culture medium is not flowed through the photobioreactor after inoculation.

[0204] In other instances culture media can be flowed though the photobioreactor throughout the time period during which the microalgae reproduce and increase in number. In some embodiments media is infused into the photobioreactor after inoculation but before the cells reach a desired density. In other words, a turbulent flow regime of gas entry and media entry is not maintained for reproduction of microalgae until a desired increase in number of said microalgae has been achieved.

[0205] Photobioreactors preferably have one or more ports that allow gas entry. Gas can serve to both provide nutrients such as CO_2 as well as to provide turbulence in the culture media. Turbulence can be achieved by placing a gas entry port below the level of the aqueous culture media so that gas entering the photobioreactor bubbles to the surface of the culture. One or more gas exit ports allow gas to escape, thereby preventing pressure buildup in the photobioreactor. Preferably a gas exit port leads to a "one-way" valve that prevents contaminating microorganisms from entering the photobioreactor. In some instances cells are

cultured in a photobioreactor for a period of time during which the microalgae reproduce and increase in number, however a turbulent flow regime with turbulent eddies predominantly throughout the culture media caused by gas entry is not maintained for all of the period of time. In other instances a turbulent flow regime with turbulent eddies predominantly throughout the culture media caused by gas entry can be maintained for all of the period of time during which the microalgae reproduce and increase in number. In some instances a predetermined range of ratios between the scale of the photobioreactor and the scale of eddies is not maintained for the period of time during which the microalgae reproduce and increase in number. In other instances such a range can be maintained.

[0206] Photobioreactors preferably have at least one port that can be used for sampling the culture. Preferably a sampling port can be used repeatedly without altering compromising the axenic nature of the culture. A sampling port can be configured with a valve or other device that allows the flow of sample to be stopped and started. Alternatively a sampling port can allow continuous sampling. Photobioreactors preferably have at least one port that allows inoculation of a culture. Such a port can also be used for other purposes such as media or gas entry.

B. Heterotrophic Growth

[0207] As an alternative to photosynthetic growth of microorganisms, as described above, some microorganisms can be cultured under heterotrophic growth conditions in which a fixed carbon source provides energy for growth and lipid accumulation.

[0208] In one heterotrophic culture method in accordance with the invention, the cost of biodiesel production, crude, partially purified, or purified glycerol produced as a byproduct of lipid transesterification can be employed as a feedstock for fermenting, for example, lipid-producing microbial cultures. Thus, the invention encompasses culturing a microbe (e.g., a microalgae) in a first microbial culture; recovering microbial lipid from the culture; subjecting the microbial lipid to transesterification to produce fatty acid ester(s) and glycerol, as described above; and adding the glycerol to a second microbial culture as a feedstock. The first and second microbial cultures can, but need not, be cultures of the same microbe. If desired, a continuous system can be devised whereby glycerol produced from the lipid recovered from a culture can be fed back into the same culture.

[0209] The invention provides significantly improved culture parameters incorporating the use of glycerol for fermentation of multiple genera of both eukaryotic and prokaryotic

microbes, including microbes of the genera *Chlorella, Navicula, Scenedesmus, and Spirulina*. As the Examples demonstrate, microbes of extremely divergent evolutionary lineages, including *Chlorella, Navicula, Scenedesmus, and Spirulina* as well as cultures of multiple distinct *Chlorella* species and strains grow very well on not only purified reagent-grade glycerol, but also on acidulated and non-acidulated glycerol byproduct from biodiesel transesterification. In some instances microalgae, such as *Chlorella* strains, undergo cell division faster in the presence of glycerol than in the presence of glucose. In these instances, two-stage growth processes in which cells are first fed glycerol to rapidly increase cell density, and are then fed glucose to accumulate lipids can improve the efficiency with which lipids are produced. The use of the glycerol byproduct of the transesterification process provides significant economic advantages when put back into the production process. Other feeding methods are provided as well, such as mixtures of glycerol and glucose. Feeding such mixtures also captures the same economic benefits. In addition, the invention provides methods of feeding alternative sugars to microalgae such as sucrose in various combinations with glycerol. These benefits provided by the invention have been demonstrated herein on microbes from extremely divergent evolutionary lineages, including both prokaryotes and eukaryotes, demonstrating the utility of the invention for microbial fermentation.

[0210] Standard methods for the growth and propagation of *Chlorella protothecoides* are known (see for example Miao and Wu, *J. Biotechnology*, 2004, 11:85-93 and Miao and Wu, *Biosource Technology* (2006) 97:841-846). The invention also provides novel growth conditions for *Chlorella*. For example, multiple species of *Chlorella* and multiple strains within a species can be grown in the presence of glycerol, including glycerol byproduct from biodiesel transesterification.

[0211] For hydrocarbon production, cells, including recombinant cells of the invention described herein, are preferably cultured or fermented in large quantities. The culturing may be in large liquid volumes, such as in suspension cultures as an example. Other examples include starting with a small culture of cells which expand into a large biomass in combination with cell growth and propagation as well as hydrocarbon production. Bioreactors or steel fermentors can be used to accommodate large culture volumes. A fermentor similar those used in the production of beer and/or wine is suitable, as are extremely large fermentors used in the production of ethanol.

[0212] Appropriate nutrient sources for culture in a fermentor are provided. These include raw materials such as one or more of the following: a fixed carbon source such as glucose, corn starch, depolymerized cellulosic material, sucrose, sugar cane, sugar beet, lactose, milk whey, or molasses; a fat source, such as fats or vegetable oils; a nitrogen source, such as protein, soybean meal, cornsteep liquor, ammonia (pure or in salt form), nitrate or nitrate salt, or molecular nitrogen; and a phosphorus source, such as phosphate salts. Additionally, a fermentor allows for the control of culture conditions such as temperature, pH, oxygen tension, and carbon dioxide levels. Optionally, gaseous components, like oxygen or nitrogen, can be bubbled through a liquid culture. Other Starch (glucose) sources such as wheat, potato, rice, and sorghum. Other carbon sources include process streams such as technical grade glycerol, black liquor, organic acids such as acetate, and molasses. Carbon sources can also be provided as a mixture, such as a mixture of sucrose and depolymerized sugar beet pulp.

[0213] A fermentor can be used to allow cells to undergo the various phases of their growth cycle. As an example, an inoculum of hydrocarbon-producing cells can be introduced into a medium followed by a lag period (lag phase) before the cells begin growth. Following the lag period, the growth rate increases steadily and enters the log, or exponential, phase. The exponential phase is in turn followed by a slowing of growth due to decreases in nutrients and/or increases in toxic substances. After this slowing, growth stops, and the cells enter a stationary phase or steady state, depending on the particular environment provided to the cells.

[0214] Hydrocarbon production by cells disclosed herein can occur during the log phase or thereafter, including the stationary phase wherein nutrients are supplied, or still available, to allow the continuation of hydrocarbon production in the absence of cell division.

[0215] Preferably, microorganisms grown using conditions described herein and known in the art comprise at least about 20% by weight of lipid, preferably at least about 40% by weight, more preferably at least about 50% by weight, and most preferably at least about 60% by weight.

[0216] A surprising discovery is that multiple species, and multiple strains within a species of *Chlorella* perform better in the presence of glycerol byproduct from transesterification than in an equivalent amount of reagent grade glycerol. Glycerol byproduct from transesterification usually contains residual methanol and other contaminants in addition to

glycerol. For example, Figures 1-6 demonstrate that strains of *Chlorella protothecoides* and *Chlorella kessleri* exhibit better productivity on acidulated and non-acidulated glycerol byproduct from lipid transesterification reactions than when grown on pure reagent grade glycerol. Other microbes, such as *Scenedesmus* and *Navicula* microalgae can also perform better in the presence of glycerol byproduct from transesterification than in an equivalent amount of reagent grade glycerol.

[0217] Dry Cell Weight per Liter: Figure 1 demonstrates that dry cell weight was higher on biodiesel glycerol byproduct than on pure glycerol, and this trend held true when the cells were grown in glycerol by itself or in combination with glucose. Figure 2 shows the same trends with additional strains of *Chlorella*. Figure 12(b) demonstrates that dry cell weight per liter of *Scenedesmus armatus* is higher on acidulated and non-acidulated biodiesel byproducts glycerol than on pure reagent grade glycerol. Figure 13 demonstrates that dry cell weight per liter of *Navicula pelliculosa* is higher on non-acidulated biodiesel byproduct glycerol than on pure reagent grade glycerol.

[0218] Lipid Content per liter: Figures 3 and 4 demonstrates that with multiple species of *Chlorella* and multiple strains within a species of *Chlorella*, lipid levels per liter are higher when the cells are cultured in the presence of biodiesel glycerol byproduct than when cultured in the presence of equivalent concentrations of pure reagent grade glycerol.

[0219] Lipid as a Percentage of Cell Weight: Figures 5 and 6 demonstrate that multiple species of *Chlorella* and multiple strains within a species of *Chlorella* accumulate a higher percentage of dry cell weight as lipid when cultured in the presence of biodiesel glycerol byproduct than when cultured in the presence of equivalent concentrations of pure reagent grade glycerol. Figure 11 demonstrates that both *Spirulina platensis* and *Navicula pelliculosa* can accumulate a higher percentage of dry cell weight as lipid when cultured in the presence of biodiesel glycerol byproduct than when cultured in the presence of equivalent concentrations of pure reagent grade glycerol. Figure 12(a) demonstrates that *Scenedesmus armatus* can accumulate a higher percentage of dry cell weight as lipid when cultured in the presence of biodiesel glycerol byproduct than when cultured in the presence of equivalent concentrations of pure reagent grade glycerol.

[0220] Another surprising result is that multiple species of microbes, including microalgae such as *Chlorella* and multiple strains within a species of *Chlorella*, and other microalgae such as *Scenedesmus*, *Navicula*, and *Spirulina* exhibit better characteristics as biodiesel

producers in the presence of mixtures of glycerol and glucose than in the presence of only glucose.

[0221] Lipid Content per liter: Figure 7 demonstrates that *Chlorella* can accumulate higher levels of lipid per liter of culture in the presence of 1% glycerol/1% glucose than in the presence of 2% glucose.

[0222] Dry Cell Weight per Liter: Figure 12(b) demonstrates that dry cell weight per liter of *Scenedesmus armatus* is higher when cultured in the presence of 1% biodiesel byproduct glycerol/1% glucose than in the presence of 2% glucose. Figure 13 demonstrates that dry cell weight per liter of *Navicula pelliculosa* is higher when cultured in the presence of 1% biodiesel byproduct glycerol/1% glucose than in the presence of 2% glucose.

[0223] Lipid as a Percentage of Cell Weight: Figure 8 demonstrates that *Chlorella* can accumulate a higher percentage of dry cell weight as lipid when cultured in the presence of an equal concentration (weight percent) mixture of glycerol and glucose than when cultured in the presence of only glucose. Figure 11(a) demonstrates that *Spirulina platensis* can accumulate a higher percentage of dry cell weight as lipid when cultured in the presence of an equal concentration (weight percent) mixture of biodiesel byproduct glycerol and glucose than when cultured in the presence of only glucose. Figure 11(b) demonstrates that *Navicula pelliculosa* can accumulate a higher percentage of dry cell weight as lipid when cultured in the presence of an equal concentration (weight percent) mixture of reagent grade glycerol and glucose, as well as biodiesel byproduct glycerol and glucose, than when cultured in the presence of only glucose. Figure 12(b) demonstrates that *Scenedesmus armatus* can accumulate a higher percentage of dry cell weight as lipid when cultured in the presence of an equal concentration (weight percent) mixture of biodiesel byproduct glycerol and glucose than when cultured in the presence of only glucose.

[0224] An additional and unexpected discovery is that adding glycerol and glucose to microbes, including microalgae such as *Chlorella, Scenedesmus*, and *Navicula* sequentially rather than as a single batch mixture of glycerol and glucose can generate additional yield gains. This attribute of multiple species of *Chlorella* and multiple strains within a species of *Chlorella* was tested in the presence of both biodiesel glycerol byproduct and reagent grade glycerol.

[0225] Lipid as a Percentage of Cell Weight: Figure 8 demonstrates that *Chlorella* can accumulate a higher percentage of dry cell weight as lipid when glycerol is added to a culture

for a first period of time, followed by addition of glucose and continued culturing for a second period of time, than when the same quantities of glycerol and glucose are added together at the beginning of the experiment.

[0226] Lipid Content per liter: Figure 9 shows *Chlorella* exhibiting higher levels of lipid per liter of culture in when glycerol and glucose are added sequentially than when the same quantities of glycerol and glucose are added together at the beginning of the experiment. This trend was observed when acidulated biodiesel byproduct glycerol, non-acidulated biodiesel byproduct glycerol, or reagent grade glycerol was used.

[0227] Dry Cell Weight per Liter: Figure 10 demonstrates four different strains of *Chlorella* of two different species accumulating higher dry cell weight per liter of culture when glycerol and glucose are added sequentially than when the same quantities of glycerol and glucose are added together at the beginning of the experiment. This trend was observed when acidulated biodiesel byproduct glycerol, non-acidulated biodiesel byproduct glycerol, or reagent grade glycerol was used. Figure 14(a) and (b) demonstrates that both *Scenedesmus armatus* and *Navicula pelliculosa* can exhibit increases in dry cell weight per liter when biodiesel byproduct glycerol only is added to a culture for a first period of time, followed later by addition of glucose, compared to adding identical amounts of glycerol and glucose at the beginning of the fermentation.

[0228] Three different markers of productivity (dry cell weight per liter, grams per liter of lipid, and percentage of dry cell weight as lipid) in microbial lipid production are improved by the use of biodiesel byproduct and temporal separation of carbon sources. The invention therefore provides novel methods of generating higher quantities of lipid per unit time in multiple species of microbes from highly divergent areas of the evolutionary tree, including both prokaryotes and eukaryotes. The methods of manufacturing lipids and hydrocarbons disclosed herein using glycerol are not limited to microalgae, but can be used with any microbe capable of utilizing glycerol as an energy source.

[0229] In an alternate heterotrophic growth method in accordance with the present invention, microorganisms can be cultured using depolymerized cellulosic biomass as a feedstock. Cellulosic biomass (e.g., stover, such as corn stover) is inexpensive and readily available; however, attempts to use this material as a feedstock for yeast have failed. In particular, such feedstock have been found to be inhibitory to yeast growth, and yeast cannot use the 5-carbon sugars produced from cellulosic materials (e.g., xylose from hemi-

cellulose). By contrast, microalgae can grow on processed cellulosic material. Accordingly, the invention provides a method of culturing a microalgae in the presence of a cellulosic material and/or a 5-carbon sugar. Cellulosic materials generally include:

Component	Percent Dry Weight
Cellulose	40-60%
Hemicellulose	20-40%
Lignin	10-30%

[0230] Suitable cellulosic materials include residues from herbaceous and woody energy crops, as well as agricultural crops, i.e., the plant parts, primarily stalks and leaves, not removed from the fields with the primary food or fiber product. Examples include agricultural wastes such as sugarcane bagasse, rice hulls, corn fiber (including stalks, leaves, husks, and cobs), wheat straw, rice straw, sugar beet pulp, citrus pulp, citrus peels; forestry wastes such as hardwood and softwood thinnings, and hardwood and softwood residues from timber operations; wood wastes such as saw mill wastes (wood chips, sawdust) and pulp mill waste; urban wastes such as paper fractions of municipal solid waste, urban wood waste and urban green waste such as municipal grass clippings; and wood construction waste. Additional cellulosics include dedicated cellulosic crops such as switchgrass, hybrid poplar wood, and miscanthus, fiber cane, and fiber sorghum. Five-carbon sugars that are produced from such materials include xylose.

[0231] Surprisingly, some species of *Chlorella* have been shown herein to exhibit higher levels of productivity when cultured on a combination of glucose and xylose than when cultured on either glucose or xylose alone. This synergistic effect provides a significant advantage in that it allows cultivation of *Chlorella* on combinations of xylose and glucose, such as cellulosic material, and is shown in Figure 15.

[0232] In still another alternative heterotrophic growth method in accordance with the present invention, which itself may optionally be used in combination with the methods described above, sucrose, produced by example from sugar cane or sugar beet, is used as a feedstock. As described in greater detail in the section entitled "Microbe Engineering" below, lipid production can be facilitated or made more efficient through the engineering of microbes such as *Chlorella*, to utilize sucrose as a carbon source. For example, expression of a sucrose transporter and a sucrose invertase allows *Chlorella* to transport sucrose into the

cell from the culture media and hydrolyze sucrose to yield glucose and fructose. Optionally, a fructokinase can be expressed as well in instances where endogenous hexokinase activity is insufficient for maximum phosphorylation of fructose. Examples of suitable sucrose transporters are Genbank accession numbers CAD91334, CAB92307, and CAA53390. Examples of suitable sucrose invertases are Genbank accession numbers CAB95010, NP_012104 and CAA06839. Examples of suitable fructokinases are Genbank accession numbers P26984, P26420 and CAA43322. Vectors for transformation of microalgae, including *Chlorella*, encoding one or more of such genes can be designed as described herein.

[0233] Secretion of a sucrose invertase can obviate the need for expression of a transporter that can transport sucrose into the cell. This is because a secreted invertase catalyzes the conversion of a molecule of sucrose into a molecule of glucose and a molecule of fructose, both of which can be transported and utilized by microbes disclosed herein. For example, expression of a sucrose invertase (such as SEQ ID NO:14) with a secretion signal (such as that of SEQ ID NO:15 (from yeast), SEQ ID NO:16 (from higher plants), SEQ ID NO:17 (eukaryotic consensus secretion signal), and SEQ ID NO:18 (combination of signal sequence from higher plants and eukaryotic consensus) generates invertase activity outside the cell. See Hawkins et al., Current Microbiology Vol. 38 (1999), pp. 335–341 for examples of secretion signals active in *Chlorella*. Expression of such a protein, as enabled by the genetic engineering methodology disclosed herein, allows cells already capable of utilizing extracellular glucose as an energy source to utilize sucrose as an extracellular energy source. In cells such as *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima*, and *Chlorella emersonii* which as demonstrated herein can use both extracellular fructose and extracellular glucose as an energy source, secretion of an invertase can provide the sole catalytic activity necessary for use of sucrose as an efficient, inexpensive energy source.

[0234] For example, as shown in Figure 26, *Chlorella protothecoides* can be engineered with a sucrose invertase gene under the regulatory control of one of three promoters (Cauliflower mosaic virus 35S promoter (CMV), Chlorella virus promoter (CV), or Chlorella HUP1 promoter (HUP1)). The sucrose invertase gene used in this example comprises a modification to the *S. cerevisiae* SUC2 gene to optimize for *C. protothecoides* codon usage. The cDNA and amino acid sequences of the optimized gene correspond to SEQ ID NO:8 and SEQ ID NO:19, respectively. An illustration of the plasmid constructs used in the transformation is shown in Figure 25. Expression of a secretable sucrose invertase, such as

that described herein, permits the use of molasses, sugar cane juice, and other sucrose-containing feedstocks for cell fermentation.

[0235] Similarly, Figures 27 and 28 show the results of transformation of *Chlorella protothecoides,* and *Chlorella minutissima* and *Chlorella emersonii*, respectively, with the sucrose invertase gene from *S. cerevisiae* under the control of the CMV promoter.

[0236] The growth potential of microorganisms expressing an exogenous secretable sucrose invertase is illustrated by the addition of an invertase to the culture medium of *Chlorella protothecoides*, as described in further detail in the Examples. Figures 23 and 24 illustrate the surprising result that *Chlorella* cells grow as well on waste molasses from sugar cane processing as they do on pure reagent-grade glucose; the use of this low-value waste product of sugar cane processing can provide significant cost savings in the production of hydrocarbons and other oils. Molasses contains lignin and other cellulosic waste products that poison many microorganisms and retard their growth, however it was discovered that *Chlorella* cells thrive in the presence of such poisons. Figures 23-24 show the growth of cells on three unique sources of molasses (designated BS1, BS2 and HTM), as compared to growth on glucose or sucrose in the presence or absence of an extracellular sucrose invertase.

[0237] Alternatively, a sucrose invertase can also be expressed intracellularly in cells that express a sucrose transporter, as well as in cells that express any carbohydrate transporter that allows sucrose to enter the cell.

[0238] A foreign gene was transformed into and expressed in *Chlorella protothecoides*, as described in Example 12. Expression of sucrose utilization genes can be accomplished using the same or similar methodology and vector design.

[0239] Bioreactors can be employed for use in heterotrophic growth methods. As will be appreciated, provisions made to make light available to the cells in photosynthetic growth methods are unnecessary when using a fixed-carbon source in the heterotrophic growth methods described herein.

[0240] The specific examples of process conditions and heterotrophic growth methods described herein can be combined in any suitable manner to improve efficiencies of microbial growth and lipid production. In addition, the invention includes the selection and/or genetic engineering of microbes, such as microalgae, to produce microbes that are even more suitable for use in the above-described methods. For example, the microbes having a greater ability

to utilize any of the above-described feedstocks for increased proliferation and/or lipid (e.g., fatty acid) production are within the scope of the invention.

C. Mixotrophic Growth

[0241] Mixotrophic growth is the use of both light and fixed carbon source(s) as energy sources for cells to grow and produce hydrocarbons. Mixotrophic growth can be conducted in a photobioreactor. Microalgae can be grown and maintained in closed photobioreactors made of different types of transparent or semitransparent material. Such material can include Plexiglas® enclosures, glass enclosures, bags made from substances such as polyethylene, transparent or semitransparent pipes, and other materials. Microalgae can be grown and maintained in open photobioreactors such as raceway ponds, settling ponds, and other non-enclosed containers.

D. Growth Media

[0242] Microorganisms useful in accordance with the methods of the present invention are found in various locations and environments throughout the world. As a consequence of their isolation from other species and their resulting evolutionary divergence, the particular growth medium for optimal growth and generation of lipid and/or hydrocarbon constituents can be difficult to predict. In some cases, certain strains of microorganisms may be unable to grow on a particular growth medium because of the presence of some inhibitory component or the absence of some essential nutritional requirement required by the particular strain of microorganism.

[0243] Solid and liquid growth media are generally available from a wide variety of sources, and instructions for the preparation of particular media that is suitable for a wide variety of strains of microorganisms can be found, for example, online at http://www.utex.org/, a site maintained by the University of Texas at Austin for its culture collection of algae (UTEX). For example, various fresh water and salt water media include those shown in Table 4, below.

[0244] Table 4. Exemplary Algal Media.

Fresh Water Media	Salt Water Media
1/2 CHEV Diatom Medium	1% F/2
1/3 CHEV Diatom Medium	1/2 Enriched Seawater Medium
1/5 CHEV Diatom Medium	1/2 Erdschreiber Medium
1:1 DYIII/PEA + Gr+	1/2 Soil+Seawater Medium
2/3 CHEV Diatom Medium	1/3 Soil+Seawater Medium

2X CHEV Diatom Medium	1/4 ERD
Ag Diatom Medium	1/4 Soil+Seawater Medium
Allen Medium	1/5 Soil+Seawater Medium
BG11-1 Medium	2/3 Enriched Sewater Medium
Bold 1NV Medium	20% Allen + 80 % ERD
Bold 3N Medium	2X Erdschreiber's Medium
Botryococcus Medium	2X Soil+Seawater Medium
Bristol Medium	5% F/2 Medium
CHEV Diatom Medium	5/3 Soil+Seawater Agar Medium
Chu's Medium	Artificial Seawater Medium
CR1 Diatom Medium	BG11-1 + .36% NaCl Medium
CR1+ Diatom Medium	BG11-1 + 1% NaCl Medium
CR1-S Diatom Medium	Bold 1NV:Erdshreiber (1:1)
Cyanidium Medium	Bold 1NV:Erdshreiber (4:1)
Cyanophycean Medium	Bristol-NaCl Medium
Desmid Medium	Dasycladales Seawater Medium
DYIII Medium	Enriched Seawater Medium
Euglena Medium	Erdschreiber's Medium
HEPES Medium	ES/10 Enriched Seawater Medium
J Medium	ES/2 Enriched Seawater Medium
Malt Medium	ES/4 Enriched Seawater Medium
MES Medium	F/2 Medium
Modified Bold 3N Medium	F/2+NH4
Modified COMBO Medium	LDM Medium
N/20 Medium	Modified 2 X CHEV
Ochromonas Medium	Modified 2 X CHEV + Soil
P49 Medium	Modified Artificial Seawater Medium
Polytomella Medium	Modified CHEV
Proteose Medium	Porphridium Medium
Snow Algae Media	Soil+Seawater Medium
Soil Extract Medium	SS Diatom Medium
Soilwater: BAR Medium	
Soilwater: GR- Medium	
Soilwater: GR-/NH4 Medium	
Soilwater: GR+ Medium	
Soilwater: GR+/NH4 Medium	
Soilwater: PEA Medium	
Soilwater: Peat Medium	
Soilwater: VT Medium	
Spirulina Medium	
Tap Medium	
Trebouxia Medium	
Volvocacean Medium	
Volvocacean-3N Medium	
Volvox Medium	
Volvox-Dextrose Medium	
Waris Medium	
Waris+Soil Extract Medium	

[0245] In a particular example, a medium suitable for culturing *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) comprises Proteose Medium. This medium is suitable for axenic cultures, and a 1L volume of the medium (pH ~6.8) can be prepared by addition of 1g of proteose peptone to 1 liter of Bristol Medium. Bristol medium comprises 2.94 mM $NaNO_3$, 0.17 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.43 mM, 1.29 mM KH_2PO_4, and 1.43 mM NaCl in an

aqueous solution. For 1.5% agar medium, 15 g of agar can be added to 1 L of the solution. The solution is covered and autoclaved, and then stored at a refrigerated temperature prior to use.

[0246] Other suitable media for use with the methods of the invention can be readily identified by consulting the URL identified above, or by consulting other organizations that maintain cultures of microorganisms, such as SAG, CCAP, or CCALA. SAG refers to the Culture Collection of Algae at the University of Göttingen (Göttingen, Germany), CCAP refers to the culture collection of algae and protozoa managed by the Scottish Association for Marine Science (Scotland, United Kingdom), and CCALA refers to the culture collection of algal laboratory at the Institute of Botany (Třeboň, Czech Republic).

E. Increasing Yield of Lipids

[0247] Process conditions can be adjusted to increase the yield of lipids suitable for a particular use and/or to reduce production cost. For example, in certain embodiments, a microbe (e.g., a microalgae) is cultured in the presence of a limiting concentration of one or more nutrients, such as, for example, carbon and/or nitrogen, phosphorous, or sulfur, while providing an excess of fixed carbon energy such as glucose. Nitrogen limitation tends to increase microbial lipid yield over microbial lipid yield in a culture in which nitrogen is provided in excess. In particular embodiments, the increase in lipid yield is at least about: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, or 500%. The microbe can be cultured in the presence of a limiting amount of a nutrient for a portion of the total culture period or for the entire period. In particular embodiments, the nutrient concentration is cycled between a limiting concentration and a non-limiting concentration at least twice during the total culture period.

[0248] To increase lipid yield, acetic acid can be employed in the feedstock for a lipid-producing microbe (e.g., a microalgae). Acetic acid feeds directly into the point of metabolism that initiates fatty acid synthesis (i.e., acetyl-CoA); thus providing acetic acid in the culture can increase fatty acid production. Generally, the microbe is cultured in the presence of a sufficient amount of acetic acid to increase microbial lipid yield, and/or microbial fatty acid yield, specifically, over microbial lipid (e.g., fatty acid) yield in the absence of acetic acid.

[0249] In another embodiment, lipid yield is increased by culturing a lipid-producing microbe (e.g., microalgae) in the presence of one or more cofactor(s) for a lipid pathway

enzyme (e.g., a fatty acid synthetic enzyme). Generally, the concentration of the cofactor(s) is sufficient to increase microbial lipid (e.g., fatty acid) yield over microbial lipid yield in the absence of the cofactor(s). In a particular embodiment, the cofactor(s) are provided to the culture by including in the culture a microbe (e.g., microalgae) containing an exogenous gene encoding the cofactor(s). Alternatively, cofactor(s) may be provided to a culture by including a microbe (e.g., microalgae) containing an exogenous gene that encodes a protein that participates in the synthesis of the cofactor. In certain embodiments, suitable cofactors include any vitamin required by a lipid pathway enzyme, such as, for example: biotin, pantothenate. Genes encoding cofactors suitable for use in the invention or that participate in the synthesis of such cofactors are well known and can be introduced into microbes (e.g., microalgae), using contructs and techniques such as those described above.

V. LIPID PATHWAY ENGINEERING

[0250] In some embodiments of the present invention, microorganisms of the present invention are modified to alter the properties and/or proportions of lipids produced and/or to increase carbon flux into lipids. The pathway can further, or alternatively, be modified to alter the properties and/or proportions of various hydrocarbon molecules produced through enzymatic processing of lipids.

A. Alteration of Properties or Proportions of Lipids or Hydrocarbons Produced

[0251] In the case of microalgae, some wild-type cells already have good growth characteristics but do not produce the desired types or quantities of lipids. Examples include *Pyrobotrys, Phormidium, Agmenellum, Carteria, Lepocinclis, Pyrobotrys, Nitzschia, Lepocinclis, Anabaena, Euglena, Spirogyra, Chlorococcum, Tetraedron, Oscillatoria, Phagus*, and *Chlorogonium,* which have the desirable growth characteristic of growing in municipal sewage or wastewater. Such cells, as well as species of *Chlorella* and other microbes, can be engineered to have improved lipid production characteristics. Desired characteristics include optimizing lipid yield per unit volume and/or per unit time, carbon chain length (e.g., for biodiesel production or for industrial applications requiring hydrocarbon feedstock), reducing the number of double or triple bonds, optionally to zero, removing or eliminating rings and cyclic structures, and increasing the hydrogen:carbon ratio of a particular species of lipid or of a population of distinct lipid. In addition, microalgae that

produce appropriate hydrocarbons can also be engineered to have even more desirable hydrocarbon outputs. Examples of such microalgae include species of the genus *Chlorella*.

1. Regulation of Enzymes that Control Branch Points in Fatty Acid Synthesis

[0252] In particular embodiments, one or more key enzymes that control branch points in metabolism to fatty acid synthesis can be up-regulated or down-regulated to improve lipid production. Up-regulation can be achieved, for example, by transforming cells with expression constructs in which a gene encoding the enzyme of interest is expressed, e.g., using a strong promoter and/or enhancer elements that increase transcription. Such constructs can include a selectable marker such that the transformants can be subjected to selection, which can result in amplification of the construct and an increase in the expression level of the encoded enzyme. Examples of enzymes suitable for up-regulation according to the methods of the invention include pyruvate dehydrogenase, which plays a role in converting pyruvate to acetyl-CoA (examples, some from microalgae, include Genbank accession numbers NP_415392; AAA53047; Q1XDM1; and CAF05587). Up-regulation of pyruvate dehydrogenase can increase production of acetyl-CoA, and thereby increase fatty acid synthesis. Acetyl-CoA carboxylase catalyzes the initial step in fatty acid synthesis. Accordingly, this enzyme can be up-regulated to increase production of fatty acids (examples, some from microalgae, include Genbank accession numbers BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP_537052; YP_536879; NP_045833; and BAA57908). Fatty acid production can also be increased by up-regulation of acyl carrier protein (ACP), which carries the growing acyl chains during fatty acid synthesis (examples, some from microalgae, include Genbank accession numbers A0T0F8; P51280; NP_849041; YP_874433) . Glycerol-3-phosphate acyltransferase catalyzes the rate-limiting step of fatty acid synthesis. Up-regulation of this enzyme can increase fatty acid production (examples, some from microalgae, include Genbank accession numbers AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857; and ABO94442). The preceding proteins are candidates for expression in microalge, including species of the genus *Chlorella*.

[0253] Down-regulation of an enzyme of interest can achieved using, e.g., antisense, catalytic RNA/DNA, RNA interference (RNA_i), "knock-out," "knock-down," or other mutagenesis techniques. Enzyme expression/function can also be inhibited using intrabodies. Examples of enzymes suitable for down-regulation according to the methods of the invention include citrate synthase, which consumes acetyl-CoA as part of the tricarboxylic acid (TCA)

cycle. Down-regulation of citrate synthase can force more acetyl-CoA into the fatty acid synthetic pathway.

2. Modulation of Global Regulators of Fatty Acid Synthetic Genes

[0254] Global regulators modulate the expression of the genes of the fatty acid biosynthetic pathways. Accordingly, one or more global regulators of fatty acid synthesis can be up- or down-regulated, as appropriate, to inhibit or enhance, respectively, the expression of a plurality of fatty acid synthetic genes and, ultimately, to increase lipid production. Examples include sterol regulatory element binding proteins (SREBPs), such as SREBP-1a and SREBP-1c (for examples see Genbank accession numbers NP_035610 and Q9WTN3). Global regulators can be up- or down-regulated, for example, as described above with respect to regulation of control point enzymes.

3. Regulation of Hydrocarbon Modification Enzymes

[0255] The methods of the invention also include transforming cells with one or more genes encoding hydrocarbon modification enzymes such as, for example, a fatty acyl-ACP thioesterase (see examples in Table 5 with accession numbers), a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase (see examples in Table 6 with accession numbers), a fatty acyl-CoA reductase (see examples in Table 7 with accession numbers), a fatty aldehyde decarbonylase (see examples in Table 8 with accession numbers), a fatty aldehyde reductase, or a squalene synthase gene (see GenBank Accession number AF205791). In some embodiments, genes encoding a fatty acyl-ACP thioesterase and a naturally co-expressed acyl carrier protein may be transformed into a cell, optionally with one or more genes encoding other hydrocarbon modification enzymes. In other embodiments, the ACP and the fatty acyl-ACP thioesterase may have an affinity for one another that imparts an advantage when the two are used together in the microbes and methods of the present invention, irrespective of whether they are or are not naturally co-expressed in a particular tissue or organism. Thus, the present invention contemplates both naturally co-expressed pairs of these enzymes as well as those that share an affinity for interacting with one another to facilitate cleavage of a length-specific carbon chain from the ACP.

[0256] In still other embodiments, an exogenous gene encoding a desaturase can be transformed into the cell in conjunction with one or more genes encoding other hydrocarbon modification enzymes in order to provide modifications with respect to hydrocarbon saturation. Stearoyl-ACP desaturase (see, e.g., GenBank Accession numbers AAF15308;

ABM45911; and AAY86086), for example, catalyzes the conversion of stearoyl-ACP to oleoyl-ACP. Up-regulation of this gene can increase the proportion of monounsaturated fatty acids produced by a cell; whereas down-regulation can reduce the proportion of monounsaturates. Similarly, the expression of one or more glycerolipid desaturases can be controlled to alter the ratio of unsaturated to saturated fatty acids such as ω-6 fatty acid desaturase, ω-3 fatty acid desaturase, or ω-6-oleate desaturase. In some embodiments, the desaturase can be selected with reference to a desired carbon chain length, such that the desaturase is capable of making location specific modifications within a specified carbon-length substrate, or substrates having a carbon-length within a specified range.

[0257] In particular embodiments, microbes of the present invention are genetically engineered to express one or more exogenous genes selected from a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, a fatty acyl-CoA reductase, a fatty aldehyde reductase, a fatty aldehyde decarbonylase, or a naturally co-expressed acyl carrier protein. Suitable expression methods are described above with respect to the expression of a lipase gene, including, among other methods, inducible expression and compartmentalized expression.

[0258] Without intending to be bound by any particular theory or cellular mechanism, a fatty acyl-ACP thioesterase cleaves a fatty acid from an acyl carrier protein (ACP) during lipid synthesis. Through further enzymatic processing, the cleaved fatty acid is then combined with a coenzyme to yield an acyl-CoA molecule. This acyl-CoA is the substrate for the enzymatic activity of a fatty acyl-CoA reductase to yield an aldehyde, as well as for a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase to yield an alcohol. The aldehyde produced by the action of the fatty acyl-CoA reductase identified above is the substrate for further enzymatic activity by either a fatty aldehyde reductase to yield an alcohol, or a fatty aldehyde decarbonylase to yield an alkane or alkene.

[0259] The enzymes described directly above have a specificity for acting on a substrate which includes a specific number of carbon atoms. For example, a fatty acyl-ACP thioesterase may have a specificity for cleaving a fatty acid having 12 carbon atoms from the ACP. In some embodiments, the ACP and the length-specific thioesterase may have an affinity for one another that makes them particularly useful as a combination (e.g., the exogenous ACP and thioesterase genes may be naturally co-expressed in a particular tissue or organism from which they are derived). Therefore, in various embodiments, the microbe can

contain an exogenous gene that encodes a protein with specificity for catalyzing an enzymatic activity (e.g., cleavage of a fatty acid from an ACP, reduction of an acyl-CoA to an aldehyde or an alcohol, or conversion of an aldehyde to an alkane) with regard to the number of carbon atoms contained in the substrate. The enzymatic specificity can, in various embodiments, be for a substrate having from 8 to 34 carbon atoms, preferably from 8 to 18 carbon atoms, and more preferably from 10 to 14 carbon atoms. The most preferred specificity is for a substrate having 12 carbon atoms. In other embodiments the specificity can be for 20 to 30 carbon atoms.

[0260] Fatty acyl-ACP thioesterases suitable for use with the microbes and methods of the invention include, without limitation, those listed in Table 5.

[0261] Table 5. Fatty acyl-ACP thioesterases and GenBank accession numbers.

Umbellularia californica fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAC49001)
Cinnamomum camphora fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #Q39473)
Umbellularia californica fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #Q41635)
Myristica fragrans fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAB71729)
Myristica fragrans fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAB71730)
Elaeis guineensis fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #ABD83939)
Elaeis guineensis fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAD42220)
Populus tomentosa fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #ABC47311)
Arabidopsis thaliana fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #NP_172327)
Arabidopsis thaliana fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #CAA85387)
Arabidopsis thaliana fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #CAA85388)
Gossypium hirsutum fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #Q9SQI3)
Cuphea lanceolata fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #CAA54060)
Cuphea hookeriana fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAC72882)
Cuphea calophylla subsp. mesostemon fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #ABB71581)
Cuphea lanceolata fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #CAC19933)
Elaeis guineensis fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAL15645)
Cuphea hookeriana fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #Q39513)
Gossypium hirsutum fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAD01982)

Vitis vinifera fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #CAN81819)
Garcinia mangostana fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAB51525)
Brassica juncea fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #ABI18986)
Madhuca longifolia fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAX51637)
Brassica napus fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #ABH11710)
Oryza sativa (indica cultivar-group) fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #EAY86877)
Oryza sativa (japonica cultivar-group) fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #NP_001068400)
Oryza sativa (indica cultivar-group) fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #EAY99617)
Cuphea hookeriana fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAC49269)

[0262] Fatty acyl-CoA/aldehyde reductases suitable for use with the microbes and methods of the invention include, without limitation, those listed in Table 6.

[0263] Table 6. Fatty acyl-CoA/aldehyde reductases listed by GenBank accession numbers.

AAC45217, YP_047869, BAB85476, YP_001086217, YP_580344, 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_01115500, 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, and BAC84377

[0264] Fatty acyl-CoA reductases suitable for use with the microbes and methods of the invention include, without limitation, those listed in Table 7.

[0265] Table 7. Fatty acyl-CoA reductases listed by GenBank accession numbers.

NP_187805, ABO14927, NP_001049083, CAN83375, NP_191229, EAZ42242, EAZ06453, CAD30696, BAD31814, NP_190040, AAD38039, CAD30692, CAN81280,

NP_197642, NP_190041, AAL15288, and NP_190042

[0266] Fatty aldehyde decarbonylases suitable for use with the microbes and methods of the invention include, without limitation, those listed in Table 8.

[0267] Table 8. Fatty aldehyde decarbonylases listed by GenBank accession numbers.

NP_850932, ABN07985, CAN60676, AAC23640, CAA65199, AAC24373, CAE03390, ABD28319, NP_181306, EAZ31322, CAN63491, EAY94825, EAY86731, CAL55686, XP_001420263, EAZ23849, NP_200588, NP_001063227, CAN83072, AAR90847, and AAR97643

[0268] Combinations of naturally co-expressed fatty acyl-ACP thioesterases and acyl carrier proteins are suitable for use with the microbes and methods of the invention.

[0269] Additional examples of hydrocarbon modification enzymes include amino acid sequences contained in, referenced in, or encoded by nucleic acid sequences contained or referenced in, any of the following US patents: 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, and further described in GenBank Accession numbers: AAO18435; ZP_00513891; Q38710; AAK60613; AAK60610; AAK60611; NP_113747; CAB75874; AAK60612; AAF20201; BAA11024; AF205791; and CAA03710.

[0270] Other suitable enzymes for use with the microbes and the methods of the invention include those that have at least 70% amino acid identity with one of the proteins listed in Tables 5-8, and that exhibit the corresponding desired enzymatic activity (e.g., cleavage of a fatty acid from an acyl carrier protein, reduction of an acyl-CoA to an aldehyde or an alcohol, or conversion of an aldehyde to an alkane). In additional embodiments, the enzymatic activity is present in a sequence that has at least about 75%, at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 99% identity with one of the above described sequences, all of which are hereby incorporated by reference as if fully set forth.

[0271] The hydrocarbon modification enzymes described above are useful in the production of various hydrocarbons from a microbe (e.g., a microalgae, an oleaginous yeast, or a fungus) or population of microbes, whereby a fatty acyl-ACP thioesterase cleaves a fatty

acid from an acyl carrier protein (ACP) during lipid synthesis. Through further enzymatic processing, the cleaved fatty acid is then combined with a coenzyme to yield an acyl-CoA molecule. This acyl-CoA is the substrate for the enzymatic activity of a fatty acyl-CoA reductase to yield an aldehyde, as well as for a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase to yield an alcohol. The aldehyde produced by the action of the fatty acyl-CoA reductase identified above is the substrate for further enzymatic activity by either a fatty aldehyde reductase to yield an alcohol, or a fatty aldehyde decarbonylase to yield an alkane or alkene.

[0272] The hydrocarbon modification enzymes have a specificity for acting on a substrate which includes a specific number of carbon atoms. For example, a fatty acyl-ACP thioesterase may have a specificity for cleaving a fatty acid having 12 carbon atoms from the ACP. Therefore, in various embodiments, the microbe can contain an exogenous gene that encodes a protein with specificity for catalyzing an enzymatic activity (e.g., cleavage of a fatty acid from an ACP, reduction of an acyl-CoA to an aldehyde or an alcohol, or conversion of an aldehyde to an alkane) with regard to the number of carbon atoms contained in the substrate. The enzymatic specificity can, in various embodiments, be for a substrate having from 8 to 34 carbon atoms, preferably from 8 to 18 carbon atoms, and more preferably from 10 to 14 carbon atoms. The most preferred specificity is for a substrate having 12 carbon atoms. In other embodiments the specificity can be for 20 to 30 carbon atoms.

[0273] In some embodiments, fatty acids, or the corresponding primary alcohols, aldehydes, alkanes or alkenes, generated by the methods described herein, contain at least about 8, at least about 10, at least about 12, at least about 14, at least about 16, at least about 18, at least about 20, at least about 22, at least about 24, at least about 26, at least about 28, at least about 30, at least about 32, or at least about 34 carbon atoms or more. Preferred fatty acids for the produciton of biodiesel, renewable diesel, or jet fuel, or the corresponding primary alcohols, aldehydes, alkanes and alkenes, for industrial applications contain at least about 8 carbon atoms or more. In certain embodiments, the above fatty acids, as well as the other corresponding hydrocarbon molecules, are saturated (with no carbon-carbon double or triple bonds); mono unsaturated (single double bond); poly unsturated (two or more double bonds); are linear (not cyclic); and/or have little or no branching in their structures.

[0274] By selecting the desired combination of exogenous genes to be expressed, one can tailor the product generated by the microbe, which may then be extracted from the aqueous biomass. For example, the microbe can contain: (i) an exogenous gene encoding a fatty

acyl-ACP thioesterase; and, optionally, (ii) a naturally co-expressed acyl carrier protein or an acyl carrier protein otherwise having affinity for the fatty acyl-ACP thioesterase (or conversely); and, optionally, (iii) an exogenous gene encoding a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase or a fatty acyl-CoA reductase; and, optionally, (iv) an exogenous gene encoding a fatty aldehyde reductase or a fatty aldehyde decarbonylase. The microbe, when cultured as described below, synthesizes a fatty acid linked to an ACP and the fatty acyl-ACP thioesterase catalyzes the cleavage of the fatty acid from the ACP to yield, through further enzymatic processing, a fatty acyl-CoA molecule. When present, the fatty acyl-CoA/aldehyde reducatase catalyzes the reduction of the acyl-CoA to an alcohol. Similarly, the fatty acyl-CoA reductase, when present, catalyzes the reduction of the acyl-CoA to an aldehyde. In those embodiments in which an exogenous gene encoding a fatty acyl-CoA reductase is present and expressed to yield an aldehyde product, a fatty aldehyde reductase, encoded by the third exogenous gene, catalyzes the reduction of the aldehyde to an alcohol. Similarly, a fatty aldehyde decarbonylase catalyzes the conversion of the aldehyde to an alkane or an alkene, when present.

[0275] Genes encoding such enzymes can be obtained from cells already known to exhibit significant lipid production such as *Chlorella protothecoides*. Genes already known to have a role in lipid production, e.g., a gene encoding an enzyme that saturates double bonds, can be transformed individually into recipient cells. However, to practice the invention it is not necessary to make *a priori* assumptions as to which genes are required. A library of DNA containing different genes, such as cDNAs from a good lipid-production organism, can be transformed into recipient cells. The cDNA is preferably in operable linkage with a promoter active in microalgae. Different recipient microalgae cells transformed by a library receive different genes from the library. Transformants having improved lipid production are identified though screening methods known in the art, such as, for example, HPLC, gas chromatography, and mass spectrometry methods of hydrocarbon analysis (for examples of such analysis, see Biomass and Bioenergy Vol. 6. No. 4. pp. 269-274 (1994); Experientia 38; 47-49 (1982); and Phytochemistry 65 (2004) 3159–3165). These transformants are then subjected to further transformation with the original library and/or optionally interbred to generate a further round of organisms having improved lipid production. General procedures for evolving whole organisms to acquire a desired property are described in, e.g., US 6,716,631. Such methods entail, e.g., introducing a library of DNA fragments into a plurality of cells, whereby at least one of the fragments undergoes recombination with a segment in the

genome or an episome of the cells to produce modified cells. The modified cells are then screened for modified cells that have evolved toward acquisition of the desired function. Vectors and methods for transformation are analogous to those discussed in connection with expression of lipase genes.

[0276] Furthermore, subtractive libraries can be used to identify genes whose transcription is induced under different conditions, especially conditions employed in culturing microorganisms for biodiesel production, or for the production of hydrocarbons useful as a feedstock for industrial applications. Subtractive libraries contain nucleotide sequences reflecting the differences between two different samples. Such libraries are prepared by procedures that include the steps of denaturing and hybridizing populations of polynucleotides (e.g., mRNA, cDNA, amplified sequences) from each sample. Sequences common to both samples hybridize and are removed, leaving the sequences that differ between the samples. In this manner, sequences that are induced under particular conditions can be identified. This technique can be employed, for example, to identify genes useful for increasing lipid (e.g., fatty acid) production and, in particular, lipid production under any desired culture conditions. The subtractive hybridization technique can also be employed to identify promoters, e.g., inducible promoters, useful in expression constructs according to the invention.

[0277] Thus, for example, subtractive libraries can be prepared from microorganism cultures grown autotrophically (in the light without a fixed carbon source) or heterotrophically (in the dark in the presence of a fixed carbon source). In particular, heterotrophic genes may be induced during dark growth in the presence of a fixed carbon source and may therefore be present in a library generated by subtracting sequences from autotrophic cells from sequences from dark heterotrophic cells. Subtractive libraries can also be prepared from cultures to which a particular carbon substrate, such as glucose, has been added to identify genes that play a role in metabolizing the substrate. Subtractive libraries prepared from cultures grown in the presence of excess versus limited nitrogen can be used to identify genes that control cell division as opposed to hydrocarbon accumulation production. The preparation of a subtractive library from a culture to which lipids (e.g., fatty acids) have been added can help identify genes whose overexpression increases fatty acid production. More specifically, the addition of fatty acids to a culture of cells that can use the added fatty acids will lead to the down-regulation of fatty acid synthetic genes to down-regulate fatty acid production. The overexpression of one or more such genes will have the opposite effect.

B. Increased Carbon Flux into Lipid Pathway

[0278] Some microalgae produce significant quantities of non-lipid metabolites, such as, for example, polysaccharides. Because polysaccharide biosynthesis can use a significant proportion of the total metabolic energy available to cells, mutagenesis of lipid-producing cells followed by screening for reduced or eliminated polysaccharide production generates novel strains that are capable of producing higher yields of lipids.

[0279] The phenol: sulfuric acid assay detects carbohydrates (see Hellebust, Handbook of Phycological Methods, Cambridge University Press, 1978; and Cuesta G., et al., J Microbiol Methods. 2003 Jan;52(1):69-73). The 1,6 dimethylmethylene blue assay detects anionic polysaccharides. (see for example Braz J Med Biol Res. 1999 May;32(5):545-50; Clin Chem. 1986 Nov;32(11):2073-6).

[0280] Polysaccharides can also be analyzed through methods such as HPLC, size exclusion chromatography, and anion exchange chromatography (see for example 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(1-3):9-18). Polysaccharides can also be detected using gel electrophoresis (see for example Anal Biochem. 2003 Oct 15;321(2):174-82; Anal Biochem. 2002 Jan 1;300(1):53-68).

VI. METHODS OF RECOVERING LIPIDS AND HYDROCARBONS

[0281] Hydrocarbons (e.g., lipids, fatty acids, aldehydes, alcohols, and alkanes) produced by cells of the invention can be harvested, or otherwise collected, by any convenient means. For example, hydrocarbons secreted from cells can be centrifuged to separate the hydrocarbons in a hydrophobic layer from contaminants in an aqueous layer and optionally from any solid materials as a precipitate in after centrifugation. Material containing cell or cell fractions can be treated with proteases to degrade contaminating proteins before or after centrifugation. In some instances the contaminating proteins are associated, possibly covalently, to hydrocarbons or hydrocarbon precursors which form hydrocarbons upon removal of the protein. In other instances the hydrocarbon molecules are in a preparation that also contains proteins. Proteases can be added to hydrocarbon preparations containing proteins to degrade proteins (for example, the protease from *Streptomyces griseus* can be used (SigmaAldrich catalog number P5147). After digestion, the hydrocarbons are preferably purified from residual proteins, peptide fragments, and amino acids. This

purification can be accomplished, for example, by methods listed above such as centrifugation and filtration.

[0282] Extracellular hydrocarbons can also be extracted *in vivo* from living microalgae cells which are then returned to a bioreactor by exposure of the cells, in an otherwise sterile environment, to a non-toxic extraction solvent, followed by separation of the living cells and the hydrophobic fraction of extraction solvent and hydrocarbons, wherein the separated living cells are then returned to a culture container such as a stainless steel fermentor or photobioreactor (see Biotechnol Bioeng. 2004 Dec 5;88(5):593-600 and Biotechnol Bioeng. 2004 Mar 5;85(5):475-81).

[0283] Hydrocarbons can also be isolated by whole cell extraction. The cells are first disrupted, as described in the section entitled "Lysing Cells", and then intracellular and cell membrane/cell wall-associated hydrocarbons as well as extracellular hydrocarbons can be collected from the whole cell mass, such as by use of centrifugation as described above.

[0284] Various methods are available for separating hydrocarbons and lipids from cellular lysates produced by the above methods. For example, hydrocarbons can be extracted with a hydrophobic solvent such as hexane (see Frenz et al. 1989, Enzyme Microb. Technol., 11:717). Hydrocarbons can also be extracted using liquefaction (see for example Sawayama et al. 1999, Biomass and Bioenergy 17:33-39 and Inoue et al. 1993, Biomass Bioenergy 6(4):269-274); oil liquefaction (see for example Minowa et al. 1995, Fuel 74(12):1735-1738); and supercritical CO_2 extraction (see for example Mendes et al. 2003, Inorganica Chimica Acta 356:328-334).

[0285] Miao and Wu describe a protocol of the recovery of microalgal lipid from a culture of *Chlorella prototheocoides* in which the cells were harvested by centrifugation, washed with distilled water and dried by freeze drying. The resulting cell powder was pulverized in a mortor and then extracted with *n*-hexane. Miao and Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846.

A. Lysing Cells

[0286] Intracellular lipids and hydrocarbons produced in microorganisms are, in some embodiments, extracted after lysing the cells of the microorganism. Once extracted, the lipids and/or hydrocarbons can be further refined to produce oils, fuels, or oleochemicals.

[0287] After completion of culturing, the microorganisms can be separated from the fermentation broth. Optionally, the separation is effected by centrifugation to generate a concentrated paste. Centrifugation does not remove significant amounts of intracellular water from the microorganisms and is not a drying step. The biomass can then be washed with a washing solution (e.g., DI water) to get rid of the fermentation broth and debris. Optionally, the washed microbial biomass may also be dried (oven dried, luyophilized, etc.) prior to cell disruption. Alternatively, cells can be lysed without separation from some or all of the fermentation broth when the fermentation is complete. For example, the cells can be at a ratio of less than 1:1 v:v cells to extracellular liquid when the cells are lysed.

[0288] Microorganisms containing a lipid and/or hydrocarbon can be lysed to produce a lysate. As detailed herein, the step of lysing a microorganism (also referred to as cell lysis) can be achieved by any convenient means, including heat-induced lysis, adding a base, adding an acid, using enzymes such as proteases and polysaccharide degradation enzymes such as amylases, using ultrasound, mechanical lysis, using osmotic shock, infection with a lytic virus, and/or expression of one or more lytic genes. Lysis is performed to release intracellular molecules which have been produced by the microorganism. Each of these methods for lysing a microorganism can be used as a single method or in combination simultaneously or sequentially.

[0289] The extent of cell disruption can be observed by microscopic analysis. Using one or more of the methods described herein, typically more than 70% cell breakage is observed. Preferably, cell breakage is more than 80%, more preferably more than 90% and most preferred about 100%.

[0290] In particular embodiments, the microorganism is lysed after growth, for example to increase the exposure of cellular lipid and/or hydrocarbon for extraction or further processing. The timing of lipase expression (e.g., via an inducible promoter) or cell lysis can be adjusted to optimize the yield of lipids and/or hydrocarbons. Below are described a number of lysis techniques. These techniques can be used individually or in combination.

1. Heat-Induced Lysis

[0291] In a preferred embodiment of the present invention, the step of lysing a microorganism comprises heating of a cellular suspension containing the microorganism. In this embodiment, the fermentation broth containing the microorganisms (or a suspension of microorganisms isolated from the fermentation broth) is heated until the microorganisms, i.e.,

the cell walls and membranes of microorganisms degrade or breakdown. Typically, temperatures applied are at least 50°C. Higher temperatures, such as, at least 30°C at least 60°C, at least 70°C, at least 80°C, at least 90°C, at least 100°C, at least 110°C, at least 120°C, at least 130°C or higher are used for more efficient cell lysis.

[0292] Lysing cells by heat treatment can be performed by boiling the microorganism. Alternatively, heat treatment (without boiling) can be performed in an autoclave. The heat treated lysate may be cooled for further treatment.

[0293] Cell disruption can also be performed by steam treatment, i.e., through addition of pressurized steam. Steam treatment of microalgae for cell disruption is described, for example, in U.S. Patent No. 6,750,048.

2. Lysis Using A Base

[0294] In another preferred embodiment of the present invention, the step of lysing a microorganism comprises adding a base to a cellular suspension containing the microorganism.

[0295] The base should be strong enough to hydrolyze at least a portion of the proteinaceous compounds of the microorganisms used. Bases which are useful for solubilizing proteins are known in the art of chemistry. Exemplary bases which are useful in the methods of the present invention include, but are not limited to, hydroxides, carbonates and bicarbonates of lithium, sodium, potassium, calcium, and mixtures thereof. A preferred base is KOH. Base treatment of microalgae for cell disruption is described, for example, in U.S. Patent No. 6,750,048.

3. Acidic Lysis

[0296] In another preferred embodiment of the present invention, the step of lysing a microorganism comprises adding an acid to a cellular suspension containing the microorganism. Acid lysis can be effected using an acid at a concentration of 10-500 mN or preferably 40-160 nM. Acid lysis is preferably performed at above room temperature (e.g., at 40-160°, and preferably a temperature of 50-130°. For moderate temperatures (e.g., room temperature to 100°C and particularly room temperature to 65°, acid treatment can usefully be combined with sonication or other cell disruption methods.

4. Lysing Cells Using Enzymes

[0297] In another preferred embodiment of the present invention, the step of lysing a microorganism comprises lysing the microorganism by using an enzyme. Preferred enzymes for lysing a microorganism are proteases and polysaccharide-degrading enzymes such as hemicellulase (e.g., hemicellulase from *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #H2125), pectinase (e.g., pectinase from *Rhizopus sp.*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #P2401), Mannaway 4.0 L (Novozymes), cellulase (e.g., cellulose from Trichoderma viride; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #C9422), and driselase (e.g., driselase from *Basidiomycetes sp.*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #D9515.

a) Cellulases

[0298] In a preferred embodiment of the present invention, a cellulase for lysing a microorganism is a polysaccharide-degrading enzyme, optionally from *Chlorella* or a *Chlorella* virus.

b) Proteases

[0299] Proteases such as Streptomyces griseus protease, chymotrypsin, proteinase K, proteases listed in 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), and other proteases can be used to lyse microorganisms. Other proteases that can be used include Alcalase 2.4 FG (Novozymes) and Flavourzyme 100 L (Novozymes).

c) Combinations

[0300] Any combination of a protease and a polysaccharide-degrading enzyme can also be used, including any combination of the preceding proteases and polysaccharide-degrading enzymes.

5. Lysing Cells Using Ultrasound

[0301] In another preferred embodiment of the present invention, the step of lysing a microorganism is performed by using ultrasound, i.e., sonication. Thus, cells can also by lysed with high frequency sound. The sound can be produced electronically and transported through a metallic tip to an appropriately concentrated cellular suspension. This sonication (or ultrasonication) disrupts cellular integrity based on the creation of cavities in cell suspension.

6. Mechanical Lysis

[0302] In another preferred embodiment of the present invention, the step of lysing a microorganism is performed by mechanical lysis. Cells can be lysed mechanically and optionally homogenized to facilitate hydrocarbon (e.g., lipid) collection. For example, a pressure disrupter can be used to pump a cell containing slurry through a restricted orifice valve. High pressure (up to 1500 bar) is applied, followed by an instant expansion through an exiting nozzle. Cell disruption is accomplished by three different mechanisms: impingement on the valve, high liquid shear in the orifice, and sudden pressure drop upon discharge, causing an explosion of the cell. The method releases intracellular molecules.

[0303] Alternatively, a ball mill can be used. In a ball mill, cells are agitated in suspension with small abrasive particles, such as beads. Cells break because of shear forces, grinding between beads, and collisions with beads. The beads disrupt the cells to release cellular contents. Cells can also be disrupted by shear forces, such as with the use of blending (such as with a high speed or Waring blender as examples), the french press, or even centrifugation in case of weak cell walls, to disrupt cells.

7. Lysing Cells By Osmotic Shock (Cytolysis)

[0304] In another preferred embodiment of the present invention, the step of lysing a microorganism is performed by applying an osmotic shock.

8. Infection With A Lytic Virus

[0305] In a preferred embodiment of the present invention, the step of lysing a microorganism comprises infection of the microorganism with a lytic virus. A wide variety of viruses are known to lyse microorganisms suitable for use in the present invention, and the selection and use of a particular lytic virus for a particular microorganism is within the level of skill in the art.

[0306] For example, *paramecium bursaria chlorella* virus (PBCV-1) is the prototype of a group (family Phycodnaviridae, genus Chlorovirus) of large, icosahedral, plaque-forming, double-stranded DNA viruses that replicate in, and lyse, certain unicellular, eukaryotic chlorella-like green algae. Accordingly, any susceptible microalgae can be lysed by infecting the culture with a suitable chlorella virus. Methods of infecting species of *Chlorella* with a chlorella virus are known. See for example *Adv. Virus Res.* 2006;66:293-336; *Virology*, 1999 Apr 25;257(1):15-23; *Virology*, 2004 Jan 5;318(1):214-23; *Nucleic Acids Symp. Ser.*

2000;(44):161-2; *J. Virol.* 2006 Mar;80(5):2437-44; and *Annu. Rev. Microbiol.* 1999;53:447-94.

9. Autolysis (Expression of a Lytic Gene)

[0307] In another preferred embodiment of the present invention, the step of lysing a microorganism comprises autolysis. In this embodiment, a microorganism according to the invention is genetically engineered to produce a lytic protein that will lyse the microorganism. This lytic gene can be expressed using an inducible promoter so that the cells can first be grown to a desirable density in a fermentor, followed by induction of the promoter to express the lytic gene to lyse the cells. In one embodiment, the lytic gene encodes a polysaccharide-degrading enzyme.

[0308] In certain other embodiments, the lytic gene is a gene from a lytic virus. Thus, for example, a lytic gene from a Chlorella virus can be expressed in an algal cell of the genus *Chlorella*, such as *C. protothecoides*.

[0309] Suitable expression methods are described herein with respect to the expression of a lipase gene. Expression of lytic genes is preferably done using an inducible promoter, such as a promoter active in microalgae that is induced by a stimulus such as the presence of a small molecule, light, heat, and other stimuli. Lytic genes from chlorella viruses are known. For example, see *Virology* 260, 308-315 (1999); *FEMS Microbiology Letters* 180 (1999) 45-53; *Virology* 263, 376-387 (1999); and *Virology* 230, 361–368 (1997).

B. Extraction of Lipids and Hydrocarbons

[0310] Lipids and hydrocarbons generated by the microorganisms of the present invention can be recovered by extraction with an organic solvent. In some cases, the preferred organic solvent is hexane. Typically, the organic solvent is added directly to the lysate without prior separation of the lysate components. In one embodiment, the lysate generated by one or more of the methods described above is contacted with an organic solvent for a period of time sufficient to allow the lipid and/or hydrocarbon components to form a solution with the organic solvent. In some cases, the solution can then be further refined to recover specific desired lipid or hydrocarbon components. Hexane extraction methods are well known in the art.

VII. METHODS OF PROCESSING LIPIDS AND HYDROCARBONS

A. Enzymatic Modification

[0311] Hydrocarbons (e.g., lipids, fatty acids, aldehydes, alcohols, and alkanes) produced by cells as described herein can be modified by the use of one or more enzymes, including a lipase, as described above. When the hydrocarbons are in the extracellular environment of the cells, the one or more enzymes can be added to that environment under conditions in which the enzyme modifies the hydrocarbon or completes its synthesis from a hydrocarbon precursor. Alternatively, the hydrocarbons can be partially, or completely, isolated from the cellular material before addition of one or more catalysts such as enzymes. Such catalysts are exogenously added, and their activity occurs outside the cell or *in vitro*.

B. Thermal and Other Catalytic Modification

[0312] Hydrocarbons produced by cells *in vivo*, or enzymatically modified *in vitro*, as described herein can be optionally further processed by conventional means. The processing can include "cracking" to reduce the size, and thus increase the hydrogen:carbon ratio, of hydrocarbon molecules. Catalytic and thermal cracking methods are routinely used in hydrocarbon and triglyceride oil processing. Catalytic methods involve the use of a catalyst, such as a solid acid catalyst. The catalyst can be silica-alumina or a zeolite, which result in the heterolytic, or asymmetric, breakage of a carbon-carbon bond to result in a carbocation and a hydride anion. These reactive intermediates then undergo either rearrangement or hydride transfer with another hydrocarbon. The reactions can thus regenerate the intermediates to result in a self-propagating chain mechanism. Hydrocarbons can also be processed to reduce, optionally to zero, the number of carbon-carbon double, or triple, bonds therein. Hydrocarbons can also be processed to remove or eliminate a ring or cyclic structure therein. Hydrocarbons can also be processed to increase the hydrogen:carbon ratio. This can include the addition of hydrogen ("hydrogenation") and/or the "cracking" of hydrocarbons into smaller hydrocarbons.

[0313] Thermal methods involve the use of elevated temperature and pressure to reduce hydrocarbon size. An elevated temperature of about 800°C and pressure of about 700kPa can be used. These conditions generate "light," a term that is sometimes used to refer to hydrogen-rich hydrocarbon molecules (as distinguished from photon flux), while also generating, by condensation, heavier hydrocarbon molecules which are relatively depleted of hydrogen. The methodology provides homolytic, or symmetrical, breakage and produces alkenes, which may be optionally enzymatically saturated as described above.

[0314] Catalytic and thermal methods are standard in plants for hydrocarbon processing and oil refining. Thus hydrocarbons produced by cells as described herein can be collected and processed or refined via conventional means. See Hillen et al. (Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIV:193-205 (1982)) for a report on hydrocracking of microalgae-produced hydrocarbons. In alternative embodiments, the fraction is treated with another catalyst, such as an organic compound, heat, and/or an inorganic compound. For processing of lipids into biodiesel, a transesterification process is used as described in Section IV herein.

[0315] Hydrocarbons produced via methods of the present invention are useful in a variety of industrial applications. For example, the production of linear alkylbenzene sulfonate (LAS), an anionic surfactant used in nearly all types of detergents and cleaning preparations, utilizes hydrocarbons generally comprising a chain of 10-14 carbon atoms. See, for example, US Patent Nos.: 6,946,430; 5,506,201; 6,692,730; 6,268,517; 6,020,509; 6,140,302; 5,080,848; and 5,567,359. Surfactants, such as LAS, can be used in the manfacture of personal care compositions and detergents, such as those described in US Patent Nos.: 5,942,479; 6,086,903; 5,833,999; 6,468,955; and 6,407,044.

VIII. METHODS OF PRODUCING FUELS SUITABLE FOR USE IN DIESEL VEHICLES AND JET ENGINES

[0316] Increasing interest is directed to the use of hydrocarbon components of biological origin in fuels, such as biodiesel, renewable diesel, and jet fuel, since renewable biological starting materials that may replace starting materials derived from fossil fuels are available, and the use thereof is desirable. There is an urgent need for methods for producing hydrocarbon components from biological materials. The present invention fulfills this need by providing methods for production of biodiesel, renewable diesel, and jet fuel using the lipids generated by the methods described herein as a biological material to produce biodiesel, renewable diesel, and jet fuel.

[0317] Traditional diesel fuels are petroleum distillates rich in paraffinic hydrocarbons. They have boiling ranges as broad as 370° to 780°F, which are suitable for combustion in a compression ignition engine, such as a diesel engine vehicle. The American Society of Testing and Materials (ASTM) establishes the grade of diesel according to the boiling range, along with allowable ranges of other fuel properties, such as cetane number, cloud point, flash point, viscosity, aniline point, sulfur content, water content, ash content, copper strip corrosion, and carbon residue. Technically, any hydrocarbon distillate material derived from

biomass or otherwise that meets the appropriate ASTM specification can be defined as diesel fuel (ASTM D975), jet fuel (ASTM D1655), or as biodiesel (ASTM D6751).

[0318] After extraction, lipid and/or hydrocarbon components recovered from the microbial biomass described herein can be subjected to chemical treatment to manufacture a fuel for use in diesel vehicles and jet engines.

A. Biodiesel

[0319] Biodiesel is a liquid which varies in color - between golden and dark brown - depending on the production feedstock. It is practically immiscible with water, has a high boiling point and low vapor pressure. Biodiesel refers to a diesel-equivalent processed fuel for use in diesel-engine vehicles. Biodiesel is biodegradable and non-toxic. An additional benefit of biodiesel over conventional diesel fuel is lower engine wear.

[0320] Typically, biodiesel comprises C14-C18 alkyl esters. Various processes convert biomass or a lipid produced and isolated as described herein to diesel fuels. A preferred method to produce biodiesel is by transesterification of a lipid as described herein. A preferred alkyl ester for use as biodiesel is a methyl ester or ethyl ester.

[0321] Biodiesel produced by a method described herein can be used alone or blended with conventional diesel fuel at any concentration in most modern diesel-engine vehicles. When blended with conventional diesel fuel (petroleum diesel), biodiesel may be present from about 0.1% to about 99.9%. Much of the world uses a system known as the "B" factor to state the amount of biodiesel in any fuel mix. For example, fuel containing 20% biodiesel is labeled B20. Pure biodiesel is referred to as B100.

[0322] Biodiesel can also be used as a heating fuel in domestic and commercial boilers. Existing oil boilers may contain rubber parts and may require conversion to run on biodiesel. The conversion process is usually relatively simple, involving the exchange of rubber parts for synthetic parts due to biodiesel being a strong solvent. Due to its strong solvent power, burning biodiesel will increase the efficiency of boilers.

[0323] Biodiesel can be used as an additive in formulations of diesel to increase the lubricity of pure Ultra-Low Sulfur Diesel (ULSD) fuel, which is advantageous because it has virtually no sulfur content.

[0324] Biodiesel is a better solvent than petrodiesel and can be used to break down deposits of residues in the fuel lines of vehicles that have previously been run on petrodiesel.

1. Production Of Biodiesel

[0325] Biodiesel can be produced by transesterification of triglycerides contained in oil-rich biomass. Thus, in another aspect of the present invention a method for producing biodiesel is provided. In a preferred embodiment, the method for producing biodiesel comprises the steps of (a) cultivating a lipid-containing microorganism using methods disclosed herein (b) lysing a lipid-containing microorganism to produce a lysate, (c) isolating lipid from the lysed microorganism, and (d) transesterifying the lipid composition, whereby biodiesel is produced.

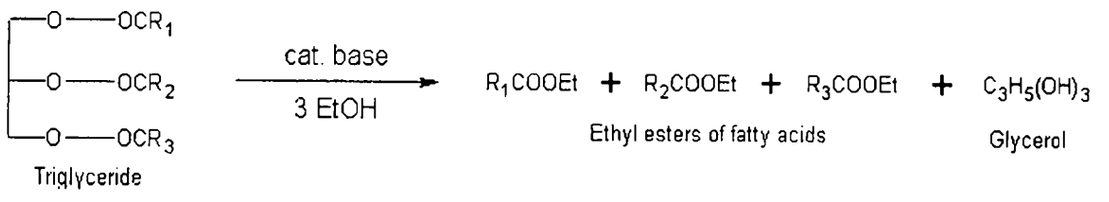
[0326] Methods for growth of a microorganism, lysing a microorganism to produce a lysate, treating the lysate in a medium comprising an organic solvent to form a heterogeneous mixture and separating the treated lysate into a lipid composition have been described above and can also be used in the method of producing biodiesel.

[0327] Lipid compositions can be subjected to transesterification to yield long-chain fatty acid esters useful as biodiesel. Preferred transesterification reactions are outlined below and include base catalyzed transesterification and transesterification using recombinant lipases.

[0328] In a base-catalyzed transesterification process, the triacylglycerides are reacted with an alcohol, such as methanol or ethanol, in the presence of an alkaline catalyst, typically potassium hydroxide. This reaction forms methyl or ethyl esters and glycerin (glycerol) as a byproduct.

a). General Chemical Process

[0329] Animal and plant oils are typically made of triglycerides which are esters of free fatty acids with the trihydric alcohol, glycerol. In transesterification, the glycerol in a triacylglyceride (TAG) is replaced with a short-chain alcohol such as methanol or ethanol. A typical reaction scheme is as follows:



[0330] In this scheme, the alcohol is deprotonated with a base to make it a stronger nucleophile. Commonly, ethanol or methanol is used in vast excess (up to 50-fold). Normally, this reaction will proceed either exceedingly slowly or not at all. Heat, as well as an acid or base can be used to help the reaction proceed more quickly. The acid or base are not consumed by the transesterification reaction, thus they are not reactants but catalysts. Almost all biodiesel has been produced using the base-catalyzed technique as it requires only low temperatures and pressures and produces over 98% conversion yield (provided the starting oil is low in moisture and free fatty acids).

b). Using Recombinant Lipases

[0331] Transesterification has also been carried out experimentally using an enzyme, such as a lipase instead of a base. Lipase-catalyzed transesterification can be carried out, for example, at a temperature between the room temperature and 80° C, and a mole ratio of the TAG to the lower alcohol of greater than 1:1, preferably about 3:1.

[0332] Lipases suitable for use in transesterification include, but are not limited to, those listed in Table 9. Other examples of lipases useful for transesterification are found in, e.g. U.S. Patent Nos. 4,798,793; 4,940,845 5,156,963; 5,342,768; 5,776,741 and WO89/01032.

[0333] Table 9. Lipases suitable for use in transesterification.

Aspergillus niger lipase ABG73614, *Candida antarctica* lipase B (novozym-435) CAA83122, *Candida cylindracea* lipase AAR24090, *Candida lipolytica* lipase (Lipase L; Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), *Candida rugosa* lipase (e.g., Lipase-OF; Meito Sangyo Co., Ltd.), *Mucor miehei* lipase (Lipozyme IM 20), *Pseudomonas fluorescens* lipase AAA25882, *Rhizopus japonicas* lipase (Lilipase A-10FG) Q7M4U7_1, *Rhizomucor miehei* lipase B34959, *Rhizopus oryzae lipase* (Lipase F) AAF32408, *Serratia marcescens* lipase (SM Enzyme) ABI13521, *Thermomyces lanuginosa* lipase CAB58509, Lipase P (Nagase ChemteX Corporation), and Lipase QLM (Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya, Japan)

[0334] One challenge to using a lipase for the production of fatty acid esters suitable for biodiesel is that the price of lipase is much higher than the price of sodium hydroxide (NaOH) used by the strong base process. This challenge has been addressed by using an immobilized lipase, which can be recycled. However, the activity of the immobilized lipase

must be maintained after being recycled for a minimum number of cycles to allow a lipase-based process to compete with the strong base process in terms of the production cost. Immobilized lipases are subject to poisoning by the lower alcohols typically used in transesterification. U.S. Patent No. 6,398,707 (issued June 4, 2002 to Wu et al.) describes methods for enhancing the activity of immobilized lipases and regenerating immobilized lipases having reduced activity.

[0335] In particular embodiments, a recombinant lipase is expressed in the same microorganisms that produce the lipid on which the lipase acts. Suitable recombinant lipases include those listed above in Table 9 and/or having GenBank Accession numbers listed above in Table 9, or a polypeptide that has at least 70% amino acid identity with one of the lipases listed above in Table 9 and that exhibits lipase activity. In additional embodiments, the enzymatic activity is present in a sequence that has at least about 75%, at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 99% identity with one of the above described sequences, all of which are hereby incorporated by reference as if fully set forth. DNA encoding the lipase and selectable marker is preferably codon-optimized cDNA. Methods of recoding genes for expression in microalgae are described in US Patent 7,135,290.

2. Standards

[0336] The common international standard for biodiesel is EN 14214. ASTM D6751 is the most common biodiesel standard referenced in the United States and Canada. Germany uses DIN EN 14214 and the UK requires compliance with BS EN 14214.

[0337] Basic industrial tests to determine whether the products conform to these standards typically include gas chromatography, HPLC, and others. Biodiesel meeting the quality standards is very non-toxic, with a toxicity rating (LD_{50}) of greater than 50 mL/kg.

B. Renewable Diesel

[0338] Renewable diesel comprises alkanes, such as C16:0 and C18:0 and thus, are distinguishable from biodiesel. High quality renewable diesel conforms to the ASTM D975 standard.

[0339] The lipids produced by the methods of the present invention can serve as feedstock to produce renewable diesel. Thus, in another aspect of the present invention, a method for producing renewable diesel is provided. Renewable diesel can be produced by at least three

processes: hydrothermal processing (hydrotreating); hydroprocessing; and indirect liquefaction. These processes yield non-ester distillates. During these processes, triacylglycerides produced and isolated as described herein, are converted to alkanes.

[0340] In a preferred embodiment, the method for producing renewable diesel comprises (a) cultivating a lipid-containing microorganism using methods disclosed herein (b) lysing the microorganism to produce a lysate, (c) isolating lipid from the lysed microorganism, and (d) deoxygenating and hydrotreating the lipid to produce an alkane, whereby renewable diesel is produced. Lipids suitable for manufacturing renewable diesel can be obtained via extraction from microbial biomass using an organic solvent such as hexane, or via other methods, such as those described in US Patent 5,928,696.

[0341] In some methods, the microbial lipid is first cracked in conjunction with hydrotreating to reduce carbon chain length and saturate double bonds, respectively. The material is then isomerized, also in conjunction with hydrotreating. The naptha fraction can then be removed through distillation, followed by additional distillation to vaporize and distill components desired in the diesel fuel to meet a D975 standard while leaving components that are heavier than desired for meeting a D 975 standard. Hydrotreating, hydrocracking, deoxygenation and isomerization methods of chemically modifying oils, including triglyceride oils, are well known in the art. See for example European patent applications EP1741768 (A1); EP1741767 (A1); EP1682466 (A1); EP1640437 (A1); EP1681337 (A1); EP1795576 (A1); and U.S. Patents 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. Hydrotreating

[0342] In a preferred embodiment of the method for producing renewable diesel, treating the lipid to produce an alkane is performed by hydrotreating of the lipid composition. In hydrothermal processing, typically, biomass is reacted in water at an elevated temperature and pressure to form oils and residual solids. Conversion temperatures are typically 300° to 660°F, with pressure sufficient to keep the water primarily as a liquid, 100 to 170 standard atmosphere (atm). Reaction times are on the order of 15 to 30 minutes. After the reaction is completed, the organics are separated from the water. Thereby a distillate suitable for diesel is produced.

2. Hydroprocessing

[0343] A renewable diesel, referred to as "green diesel," can be produced from fatty acids by traditional hydroprocessing technology. The triglyceride-containing oils can be hydroprocessed either as co-feed with petroleum or as a dedicated feed. The product is a diesel fuel that conforms with the ASTM D975 specification. Thus, in another preferred embodiment of the method for producing renewable diesel, treating the lipid composition to produce an alkane is performed by hydroprocessing of the lipid composition.

[0344] In some methods of making renewable diesel, the first step of treating a triglyceride is hydroprocessing to saturate double bonds, followed by deoxygenation at elevated temperature in the presence of hydrogen and a catalyst. In some methods, hydrogenation and deoxygenation occur in the same reaction. In other methods deoxygenation occurs before hydrogenation. Isomerization is then optionally performed, also in the presence of hydrogen and a catalyst. Naphtha components are preferably removed through distillation. For examples, see U.S. Patents 5,475,160 (hydrogenation of triglycerides); 5,091,116 (deoxygenation, hydrogenation and gas removal); 6,391,815 (hydrogenation); and 5,888,947 (isomerization).

[0345] Petroleum refiners use hydroprocessing to remove impurities by treating feeds with hydrogen. Hydroprocessing conversion temperatures are typically 300° to 700°F. Pressures are typically 40 to 100 atm. The reaction times are typically on the order of 10 to 60 minutes.

[0346] Solid catalysts are employed to increase certain reaction rates, improve selectivity for certain products, and optimize hydrogen consumption.

[0347] Hydrotreating and hydroprocessing ultimately lead to a reduction in the molecular weight of the feed. In the case of triglyceride-containing oils, the triglyceride molecule is reduced to four hydrocarbon molecules under hydroprocessing conditions: a propane molecule and three heavier hydrocarbon molecules, typically in the C8 to C18 range.

3. Indirect Liquefaction

[0348] A traditional ultra-low sulfur diesel can be produced from any form of biomass by a two-step process. First, the biomass is converted to a syngas, a gaseous mixture rich in hydrogen and carbon monoxide. Then, the syngas is catalytically converted to liquids. Typically, the production of liquids is accomplished using Fischer-Tropsch (FT) synthesis. This technology applies to coal, natural gas, and heavy oils. Thus, in yet another preferred

embodiment of the method for producing renewable diesel, treating the lipid composition to produce an alkane is performed by indirect liquefaction of the lipid composition.

C. Jet Fuel

[0349] The annual U.S. usage of jet fuel in 2006 was about 21 billion gallons (about 80 billion liters). Aeroplane fuel is clear to straw colored. The most common fuel is an unleaded/paraffin oil-based fuel classified as Aeroplane A-1, which is produced to an internationally standardized set of specifications. Aeroplane fuel is a mixture of a large number of different hydrocarbons, possibly as many as a thousand or more. The range of their sizes (molecular weights or carbon numbers) is restricted by the requirements for the product, for example, freezing point or smoke point. Kerosone-type Aeroplane fuel (including Jet A and Jet A-1) has a carbon number distribution between about 8 and 16 carbon numbers. Wide-cut or naphta-type Aeroplane fuel (including Jet B) typically has a carbon number distribution between about 5 and 15 carbons.

[0350] Both Aeroplanes (Jet A and jet B) may contain a number of additives. Useful additives include, but are not limited to, antioxidants, antistatic agents, corrosion inhibitors, and fuel system icing inhibitor (FSII) agents. Antioxidants prevent gumming and usually, are based on alkylated phenols, for example, AO-30, AO-31, or AO-37. Antistatic agents dissipate static electricity and prevent sparking. Stadis 450 with dinonylnaphthylsulfonic acid (DINNSA) as the active ingredient, is an example. Corrosion inhibitors, e.g., DCI-4A is used for civilian and military fuels and DCI-6A is used for military fuels. FSII agents, include, e.g., Di-EGME.

[0351] A solution is blending algae fuels with existing jet fuel. The present invention provides such a solution. The lipids produced by the methods of the present invention can serve as feedstock to produce jet fuel. Thus, in another aspect of the present invention, a method for producing jet fuel is provided. Herewith two methods for producing jet fuel from the lipids produced by the methods of the present invention are provided: fluid catalytic cracking (FCC); and hydrodeoxygenation (HDO).

1. **Fluid Catalytic Cracking**

[0352] Fluid Catalytic Cracking (FCC) is one method which is used to produce olefins, especially propylene from heavy crude fractions. There are reports in the literature that vegetable oils such as canola oil could be processed using FCC to give a hydrocarbon stream useful as a gasoline fuel.

[0353] The lipids produced by the method of the present invention can be converted to olefins. The process involves flowing the lipids produced through an FCC zone and collecting a product stream comprised of olefins, which is useful as a jet fuel. The lipids produced are contacted with a cracking catalyst at cracking conditions to provide a product stream comprising olefins and hydrocarbons useful as jet fuel.

[0354] In a preferred embodiment, the method for producing jet fuel comprises (a) cultivating a lipid-containing microorganism using methods disclosed herein, (b) lysing the lipid-containing microorganism to produce a lysate, (c) isolating lipid from the lysate, and (d) treating the lipid composition, whereby jet fuel is produced.

[0355] In a preferred embodiment of the method for producing a jet fuel, the lipid composition can be flowed through a fluid catalytic cracking zone, which, in one embodiment, may comprise contacting the lipid composition with a cracking catalyst at cracking conditions to provide a product stream comprising C_2-C_5 olefins.

[0356] In certain embodiments of this method it may be desirable to remove any contaminants that may be present in the lipid composition. Thus, prior to flowing the lipid composition through a fluid catalytic cracking zone, the lipid composition is pretreated. Pretreatment may involve contacting the lipid composition with an ion-exchange resin. The ion exchange resin is an acidic ion exchange resin, such as Amberlyst™-15 and can be used as a bed in a reactor through which the lipid composition is flowed, either upflow or downflow. Other pretreatments may include mild acid washes by contacting the lipid composition with an acid, such as sulfuric, acetic, nitric, or hydrochloric acid. Contacting is done with a dilute acid solution usually at ambient temperature and atmospheric pressure.

[0357] The lipid composition, optionally pretreated, is flowed to an FCC zone where the hydrocarbonaceous components are cracked to olefins. Catalytic cracking is accomplished by contacting the lipid composition in a reaction zone with a catalyst composed of finely divided particulate material. The reaction is catalytic cracking, as opposed to hydrocracking, and is carried out in the absence of added hydrogen or the consumption of hydrogen. As the cracking reaction proceeds, substantial amounts of coke are deposited on the catalyst. The catalyst is regenerated at high temperatures by burning coke from the catalyst in a regeneration zone. Coke-containing catalyst, referred to herein as "coked catalyst", is continually transported from the reaction zone to the regeneration zone to be regenerated and replaced by essentially coke-free regenerated catalyst from the regeneration zone.

Fluidization of the catalyst particles by various gaseous streams allows the transport of catalyst between the reaction zone and regeneration zone. Methods for cracking hydrocarbons, such as those of the lipid composition described herein, in a fluidized stream of catalyst, transporting catalyst between reaction and regeneration zones, and combusting coke in the regenerator are well known by those skilled in the art of FCC processes. Exemplary FCC applications and catalysts useful for cracking the lipid composition to produce C_2-C_5 olefins are described in U.S. Pat. Nos. 6,538,169, 7,288,685, which are incorporated in their entirety by reference.

[0358] In one embodiment, cracking the lipid composition of the present invention, takes place in the riser section or, alternatively, the lift section, of the FCC zone. The lipid composition is introduced into the riser by a nozzle resulting in the rapid vaporization of the lipid composition. Before contacting the catalyst, the lipid composition will ordinarily have a temperature of about 149°C to about 316°C (300°F to 600°F). The catalyst is flowed from a blending vessel to the riser where it contacts the lipid composition for a time of abort 2 seconds or less.

[0359] The blended catalyst and reacted lipid composition vapors are then discharged from the top of the riser through an outlet and separated into a cracked product vapor stream including olefins and a collection of catalyst particles covered with substantial quantities of coke and generally referred to as "coked catalyst." In an effort to minimize the contact time of the lipid composition and the catalyst which may promote further conversion of desired products to undesirable other products, any arrangement of separators such as a swirl arm arrangement can be used to remove coked catalyst from the product stream quickly. The separator, e.g. swirl arm separator, is located in an upper portion of a chamber with a stripping zone situated in the lower portion of the chamber. Catalyst separated by the swirl arm arrangement drops down into the stripping zone. The cracked product vapor stream comprising cracked hydrocarbons including light olefins and some catalyst exit the chamber via a conduit which is in communication with cyclones. The cyclones remove remaining catalyst particles from the product vapor stream to reduce particle concentrations to very low levels. The product vapor stream then exits the top of the separating vessel. Catalyst separated by the cyclones is returned to the separating vessel and then to the stripping zone. The stripping zone removes adsorbed hydrocarbons from the surface of the catalyst by counter-current contact with steam.

[0360] Low hydrocarbon partial pressure operates to favor the production of light olefins. Accordingly, the riser pressure is set at about 172 to 241 kPa (25 to 35 psia) with a hydrocarbon partial pressure of about 35 to 172 kPa (5 to 25 psia), with a preferred hydrocarbon partial pressure of about 69 to 138 kPa (10 to 20 psia). This relatively low partial pressure for hydrocarbon is achieved by using steam as a diluent to the extent that the diluent is 10 to 55 wt-% of lipid composition and preferably about 15 wt-% of lipid composition. Other diluents such as dry gas can be used to reach equivalent hydrocarbon partial pressures.

[0361] The temperature of the cracked stream at the riser outlet will be about 510°C to 621°C (950°F to 1150°F). However, riser outlet temperatures above 566°C (1050°F) make more dry gas and more olefins. Whereas, riser outlet temperatures below 566°C (1050°F) make less ethylene and propylene. Accordingly, it is preferred to run the FCC process at a preferred temperature of about 566°C to about 630°C, preferred pressure of about 138 kPa to about 240 kPa (20 to 35 psia). Another condition for the process is the catalyst to lipid composition ratio which can vary from about 5 to about 20 and preferably from about 10 to about 15.

[0362] In one embodiment of the method for producing a jet fuel, the lipid composition is introduced into the lift section of an FCC reactor. The temperature in the lift section will be very hot and range from about 700°C (1292°F) to about 760°C (1400°F) with a catalyst to lipid composition ratio of about 100 to about 150. It is anticipated that introducing the lipid composition into the lift section will produce considerable amounts of propylene and ethylene.

[0363] Gas and liquid hydrocarbon products produced can be analyzed by gas chromatography, HPLC, etc.

2. Hydrodeoxygenation

[0364] In another embodiment of the method for producing a jet fuel using the lipid composition or the lipids produced as described herein, the structure of the lipid composition or the lipids is broken by a process referred to as hydrodeoxygenation (HDO).

[0365] HDO means removal of oxygen by means of hydrogen, that is, oxygen is removed while breaking the structure of the material. Olefinic double bonds are hydrogenated and any sulphur and nitrogen compounds are removed. Sulphur removal is called

hydrodesulphurization (HDS). Pretreatment and purity of the raw materials (lipid composition or the lipids) contribute to the service life of the catalyst.

[0366] Generally in the HDO/HDS step, hydrogen is mixed with the feed stock (lipid composition or the lipids) and then the mixture is passed through a catalyst bed as a co-current flow, either as a single phase or a two phase feed stock. After the HDO/MDS step, the product fraction is separated and passed to a separate isomerzation reactor. An isomerization reactor for biological starting material is described in the literature (FI 100 248) as a co-current reactor.

[0367] The process for producing a fuel by hydrogenating a hydrocarbon feed, e.g., the lipid composition or the lipids herein, can also be performed by passing the lipid composition or the lipids as a co-current flow with hydrogen gas through a first hydrogenation zone, and thereafter the hydrocarbon effluent is further hydrogenated in a second hydrogenation zone by passing hydrogen gas to the second hydrogenation zone as a counter-current flow relative to the hydrocarbon effluent. Exemplary HDO applications and catalysts useful for cracking the lipid composition to produce C_2-C_5 olefins are described in U.S. Pat. No. 7,232,935, which is incorporated in its entirety by reference.

[0368] Typically, in the hydrodeoxygenation step, the structure of the biological component, such as the lipid composition or lipids herein, is decomposed, oxygen, nitrogen, phosphorus and sulphur compounds, and light hydrocarbons as gas are removed, and the olefinic bonds are hydrogenated. In the second step of the process, i.e. in the so-called isomerization step, isomerzation is carried out for branching the hydrocarbon chain and improving the performance of the paraffin at low temperatures.

[0369] In the first step i.e. HDO step of the cracking process, hydrogen gas and the lipid composition or lipids herein which are to be hydrogenated are passed to a HDO catalyst bed system either as co-current or counter-current flows, said catalyst bed system comprising one or more catalyst bed(s), preferably 1-3 catalyst beds. The HDO step is typically operated in a co-current manner. In case of a HDO catalyst bed system comprising two or more catalyst beds, one or more of the beds may be operated using the counter-current flow principle.

[0370] In the HDO step, the pressure varies between 20 and 150 bar, preferably between 50 and 100 bar, and the temperature varies between 200 and 500°C, preferably in the range of 300-400°C.

[0371] In the HDO step, known hydrogenation catalysts containing metals from Group VII and/or VIB of the Periodic System may be used. Preferably, the hydrogenation catalysts are supported Pd, Pt, Ni, NiMo or a CoMo catalysts, the support being alumina and/or silica. Typically, $NiMo/Al_2O_3$ and $CoMo/Al_2O_3$ catalysts are used.

[0372] Prior to the HDO step, the lipid composition or lipids herein may optionally be treated by prehydrogenation under milder conditions thus avoiding side reactions of the double bonds. Such prehydrogenation is carried out in the presence of a prehydrogenation catalyst at temperatures of 50 400°C and at hydrogen pressures of 1 200 bar, preferably at a temperature between 150 and 250°C and at a hydrogen pressure between 10 and 100 bar. The catalyst may contain metals from Group VIII and/or VIB of the Periodic System. Preferably, the prehydrogenation catalyst is a supported Pd, Pt, Ni, NiMo or a CoMo catalyst, the support being alumina and/or silica.

[0373] A gaseous stream from the HDO step containing hydrogen is cooled and then carbon monoxide, carbon dioxide, nitrogen, phosphorus and sulphur compounds, gaseous light hydrocarbons and other impurities are removed therefrom. After compressing, the purified hydrogen or recycled hydrogen is returned back to the first catalyst bed and/or between the catalyst beds to make up for the withdrawn gas stream. Water is removed from the condensed liquid. The liquid is passed to the first catalyst bed or between the catalyst beds.

[0374] After the HDO step, the product is subjected to an isomerization step. It is substantial for the process that the impurities are removed as completely as possible before the hydrocarbons are contacted with the isomerization catalyst. The isomerization step comprises an optional stripping step, wherein the reaction product from the HDO step may be purified by stripping with water vapour or a suitable gas such as light hydrocarbon, nitrogen or hydrogen. The optional stripping step is carried out in counter-current manner in a unit upstream of the isomerization catalyst, wherein the gas and liquid are contacted with each other, or before the actual isomerization reactor in a separate stripping unit utilizing counter-current principle.

[0375] After the stripping step the hydrogen gas and the hydrogenated lipid composition or lipids herein, and optionally an n-paraffin mixture, are passed to a reactive isomerization unit comprising one or several catalyst bed(s). The catalyst beds of the isomerization step may operate either in co-current or counter-current manner.

[0376] It is important for the process that the counter-current flow principle is applied in the isomerization step. In the isomerization step this is done by carrying out either the optional stripping step or the isomerization reaction step or both in counter-current manner.

[0377] The isomerization step and the HDO step may be carried out in the same pressure vessel or in separate pressure vessels. Optional prehydrogenation may be carried out in a separate pressure vessel or in the same pressure vessel as the HDO and isomerization steps.

[0378] In the isomerzation step, the pressure varies in the range of 20 150 bar, preferably in the range of 20 100 bar, the temperature being between 200 and 500°C, preferably between 300 and 400°C.

[0379] In the isomerization step, isomerization catalysts known in the art may be used. Suitable isomerization catalysts contain molecular sieve and/or a metal from Group VII and/or a carrier. Preferably, the isomerization catalyst contains SAPO-11 or SAPO41 or ZSM-22 or ZSM-23 or ferrierite and Pt, Pd or Ni and Al_2O_3 or SiO_2. Typical isomerization catalysts are, for example, Pt/SAPO-11/Al_2O_3, Pt/ZSM-22/Al_2O_3, Pt/ZSM-23/Al_2O_3 and Pt/SAPO-11/SiO_2.

[0380] As the product, a high quality hydrocarbon component of biological origin, useful as a diesel fuel or a component thereof, is obtained, the density, cetane number and performance at low temperate of said hydrocarbon component being excellent.

IX. MICROBE ENGINEERING

[0381] As noted above, in certain embodiments of the present invention it is desirable to genentically modify a microorganism to enhance lipid production, modify the properties or proportions of components generated by the microorganism, or to improve or provide de novo growth characteristics on a variety of feedstock materials. *Chlorella*, particularly *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.*, and *Chlorella emersonii* are preferred microorganisms for use in the genetic engineering methods described herein, although other *Chlorella* species as well as other varieties of microorganisms can be used.

[0382] Promoters, cDNAs, and 3'UTRs, as well as other elements of the vectors, can be generated through cloning techniques using fragments isolated from native sources (see for example Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3d edition, 2001, Cold

Spring Harbor Press; and U.S. Patent 4,683,202). Alternatively, elements can be generated synthetically using known methods (see for example Gene. 1995 Oct 16;164(1):49-53).

A. Codon-Optimization For Expression

[0383] DNA encoding a polypeptide to be expressed in a microorganism, e.g., a lipase and selectable marker are preferably codon-optimized Cdna. Methods of recoding genes for expression in microalgae are described in U.S. Patent 7,135,290. Additional information for codon optimization is available, e.g., at the codon usage database of GenBank. As non-limiting examples, codon usage in *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella salina*, and *Chlorella protothecoides* are shown in Tables 10, 11, and 12, respectively.

[0384] Table 10. Codon usage in *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)
	AUC	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)

[0385] Table 11. Preferred codon usage in *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)			

[0386] Table 12. Preferred codon usage in *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. Promoters

[0387] Many promoters are active in microalgae, including promoters that are endogenous to the algae being transformed, as well as promoters that are not endogenous to the algae being transformed (i.e., promoters from other algae, promoters from higher plants, and promoters from plant viruses or algae viruses). Exogenous and/or endogenous promoters that are active in microalgae, and antibiotic resistance genes functional in microalgae are described by e.g., Curr Microbiol. 1997 Dec;35(6):356-62 (Chlorella vulgaris); Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan;4(1):63-73 (Chlorella ellipsoidea); Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9 (Phaeodactylum tricornutum); Plant Mol Biol. 1996 Apr;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;1(3):239-251 (Laboratory of Molecular Plant Biology, Stazione Zoologica, Villa Comunale, I-80121 Naples, Italy) (Phaeodactylum tricornutum and Thalassiosira weissflogii); Plant Physiol. 2002 May;129(1):7-12. (Porphyridium sp.); Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 21;100(2):438-42. (Chlamydomonas reinhardtii); Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Feb;87(3):1228-32. (Chlamydomonas reinhardtii); Nucleic Acids Res. 1992 Jun 25;20(12):2959-65; Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan;4(1):63-73 (Chlorella); Biochem Mol Biol Int. 1995 Aug;36(5):1025-35 (Chlamydomonas reinhardtii); J Microbiol. 2005 Aug;43(4):361-5 (Dunaliella); Yi Chuan Xue Bao. 2005 Apr;32(4):424-33 (Dunaliella); Mar Biotechnol (NY). 1999 May;1(3):239-251. (Thalassiosira and Phaedactylum); Koksharova,

Appl Microbiol Biotechnol 2002 Feb;58(2):123-37 (various species); Mol Genet Genomics. 2004 Feb;271(1):50-9 (Thermosynechococcus elongates); J. Bacteriol. (2000), 182, 211-215; FEMS Microbiol Lett. 2003 Apr 25;221(2):155-9; Plant Physiol. 1994 Jun;105(2):635-41; Plant Mol Biol. 1995 Dec;29(5):897-907 (Synechococcus PCC 7942); Mar Pollut Bull. 2002;45(1-12):163-7 (Anabaena PCC 7120); Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Mar;81(5):1561-5 (Anabaena (various strains)); Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27;98(7):4243-8 (Synechocystis); Wirth, Mol Gen Genet 1989 Mar;216(1):175-7 (various species); Mol Microbiol, 2002 Jun;44(6):1517-31 and 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); for additional promoters see also table 1 from US Patent 6,027,900).

[0388] The promoter used to express an exogenous gene can be the promoter naturally linked to that gene or can be a heterologous gene. Some promoters are active in more than one species of microalgae. Other promoters are species-specific. Preferred promoters include promoters such as RBCS2 from *Chlamydomonas reinhardtii* and viral promoters, such as cauliflower mosaic virus (CMV) and chlorella virus, which have been shown to be active in multiple species of microalgae (see for example Plant Cell Rep. 2005 Mar;23(10-11):727-35; J Microbiol. 2005 Aug;43(4):361-5; Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan;4(1):63-73). In other embodiments, the *Botryococcus* malate dehydrogenase promoter, such a nucleic acid comprising any part of SEQ ID NO:3, or the *Chlamydomonas reinhardtii* RBCS2 promoter (SEQ ID NO:4) can be used. Optionally, at least 10, 20, 30, 40, 50, or 60 nucleotides or more of these sequences containing a promoter are used. Preferred promoters endogenous to species of the genus *Chlorella* are SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

[0389] Preferred promoters useful for expression of exogenous genes in *Chlorella* are listed in the sequence listing of this application, such as the promoter of the *Chlorella* HUP1 gene (SEQ ID NO:1) and the *Chlorella ellipsoidea* nitrate reductase promoter (SEQ ID NO:2). Chlorella virus promoters can also be used to express genes in *Chlorella*, such as SEQ ID NOs: 1-7 of U.S. Patent 6,395,965. Additional promoters active in *Chlorella* can be found, for example, in Biochem Biophys Res Commun. 1994 Oct 14;204(1):187-94; Plant Mol Biol. 1994 Oct;26(1):85-93; Virology. 2004 Aug 15;326(1):150-9; and Virology. 2004 Jan 5;318(1):214-23.

C. Selectable Markers

[0390] Any of a wide variety of selectable markers can be employed in a transgene construct useful for transforming *Chlorella*. Examples of suitable selectable markers include the nitrate reductase gene, the hygromycin phosphotransferase gene (HPT), the neomycin phosphotransferase gene, and the ble gene, which confers resistance to phleomycin. Methods of determining sensitivity of microalgae to antibiotics are well known. For example, Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9.

[0391] More specifically, Dawson et al. (1997), Current Microbiology 35:356-362 (incorporated by reference herein in its entirety), described the use of the nitrate reductase (NR) gene from *Chlorella vulgaris* as a selectable marker for NR-deficient *Chlorella sorokiniana* mutants. Kim et al. (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73 (incorporated by reference herein in its entirety), disclosed the use of the HPT gene as a selectable marker for transforming *Chorella ellipsoidea*. Huang et al. (2007), Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:197-205 (incorporated by reference herein in its entirety), reported on the use of Sh ble as a selectable marker for *Chlorella sp. DT.*

D. Inducible Expression

[0392] The present invention also provides for the use of an inducible promoter to express a gene of interest. In particular, the use of an inducible promoter to express a lipase gene permits production of the lipase after growth of the microorganism when conditions have been adjusted, if necessary, to enhance transesterification, for example, after disruption of the cells, reduction of the water content of the reaction mixture, and/or addition sufficient alcohol to drive conversion of TAGs to fatty acid esters.

[0393] Inducible promoters useful in the invention include those that mediate transcription of an operably linked gene in response to a stimulus, such as an exogenously provided small molecule (e.g, glucose, as in SEQ ID NO:1), temperature (heat or cold), light, etc. Suitable promoters can activate transcription of an essentially silent gene or upregulate, preferably substantially, transcription of an operably linked gene that is transcribed at a low level. In the latter case, the level of transcription of the lipase preferably does not significantly interfere with the growth of the microorganism in which it is expressed.

[0394] Expression of transgenes in *Chlorella* can be performed inducibly through promoters such as the promoter that drives the *Chlorella* hexose transporter gene (SEQ ID NO:1). This promoter is strongly activated by the presence of glucose in the culture media.

E. Expression of Two or More Exogenous Genes

[0395] Further, a genetically engineered microorganism, such as a microalgae, may comprise and express two or more exogenous genes, such as, for example, a lipase and a lytic gene, e.g., one encoding a polysaccharide-degrading enzyme. One or both genes can be expressed using an inducible promoter, which allows the relative timing of expression of these genes to be controlled to enhance the lipid yield and conversion to fatty acid esters. Expression of the two or more exogenous genes may be under control of the same inducible promoter or under control of a different inducible promoters. In the latter situation, expression of a first exogenous gene can be induced for a first period of time (during which expression of a second exogenous gene may or may not be induced) and expression of a second exogenous gene can be induced for a second period of time (during which expression of a first exogenous gene may or may not be induced). Provided herein are vectors and methods for engineering lipid-producing microbes to metabolize sucrose, which is an advantageous trait because it allows the engineered cells to convert sugar cane feedstocks into lipids.

[0396] Also provided herein are genetically engineered strains of microbes (e.g., microalgae, oleaginous yeast, bacteria, or fungi) that express two or more exogenous genes, such as, for example, a fatty acyl-ACP thioesterase and a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, the combined action of which yields an alcohol product. Further provided are other combinations of exogenous genes, including without limitation, a fatty acyl-ACP thioesterase and a fatty acyl-CoA reductase to generate aldehydes. In addition, this application provides for the combination of a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA reductase, and a fatty aldehyde decarbonylase to generate alkanes. One or more of the exogenous genes can be expressed using an inducible promoter.

[0397] Examples of further modifications suitable for use in the present invention are include genetically engineering strains of microalgae to express two or more exogenous genes, one encoding a transporter of a fixed carbon source (such as sucrose) and a second encoding a sucrose invertase enzyme. The resulting fermentable organisms produce hydrocarbons at lower manufacturing cost than what has been obtainable by previously known methods of biological hydrocarbon production. Insertion of the two exogenous genes described above can be combined with the disruption of polysaccharide biosynthesis through directed and/or random mutagenesis, which steers ever greater carbon flux into hydrocarbon production.

Individually and in combination, trophic conversion, engineering to alter hydrocarbon production and treatment with exogenous enzymes alter the hydrocarbon composition produced by a microorganism. The alteration can be a change in the amount of hydrocarbons produced, the amount of one or more hydrocarbon species produced relative to other hydrocarbons, and/or the types of hydrocarbon species produced in the microorganism. For example, microalgae can be engineered to produce a higher amount and/or percentage of TAGs.

F. Compartmentalized Expression

[0398] The present invention also provides for compartmentalized expression of a gene of interest. In particular, it can be advantageous, in particular embodiments, to target expression of the lipase to one or more cellular compartments, where it is sequestered from the majority of cellular lipids until initiation of the transesterification reaction. Preferred organelles for targeting are chloroplasts, mitochondria, and endoplasmic reticulum.

1. Expression in Chloroplasts

[0399] In one embodiment of the present invention, the expression of a polypeptide in a microorganism is targeted to chloroplasts. Methods for targeting expression of a heterologous gene to the chloroplast are known and can be employed in the present invention. Methods for targeting foreign gene products into chloroplasts are described in Shrier et al., EMBO J. (1985) 4:25 32. See also Tomai et al. Gen. Biol. Chem. (1988) 263:15104 15109 and U.S. Pat. No. 4,940,835 for the use of transit peptides for translocating nuclear gene products into the chloroplast. Methods for directing the transport of proteins to the chloroplast are also reviewed in Kenauf TIBTECH (1987) 5:40 47. Chloroplast targeting sequences endogenous to *Chlorella* are known, such as genes in the *Chlorella* nuclear genome that encode proteins that are targeted to the chloroplast; see for example GenBank Accession numbers AY646197 and AF499684.

[0400] Wageningen UR- Plant Research International sells an IMPACTVECTOR1.4 vector, which uses the secretion signal of the Chrysanthemum morifolium small subunit protein to deliver a heterologous protein into the chloroplast stroma (cytoplasmic) environment, shuttling across a double membrane system. The protein is fused to the first 11 amino acids of the mature rubisco protein in order to allow proper processing of the signal peptide (Wong et al., Plant Molecular Biology 20: 81-93 (1992)). The signal peptide contains a natural intron from the RbcS gene.

[0401] In another approach, the chloroplast genome is genetically engineered to express the heterologous protein. Stable transformation of chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii* (a green alga) using bombardment of recipient cells with high-velocity tungsten microprojectiles coated with foreign DNA has been described. See, for example, Boynton et al., Science (1988) 240: 1534 1538; Blowers et al. Plant Cell (1989) 1:123 132 and Debuchy et al., EMBO J. (1989) 8: 2803 2809. The transformation technique, using tungsten microprojectiles, is described by Klein et al., Nature (London) (1987) 7:70 73. Other methods of chloroplast transformation for both plants and microalgae are known. See for example U.S. Patents 5,693,507; 6,680,426; and Plant Physiol. 2002 May;129(1):7-12; and Plant Biotechnol J. 2007 May;5(3):402-12.

[0402] As described in U.S. Patent No. 6,320,101 (issued November 20, 2001 to Kaplan et al.; which is incorporated herein by reference), cells can be chemically treated so as to reduce the number of chloroplasts per cell to about one. Then, the heterologous nucleic acid can be introduced into the cells via particle bombardment with the aim of introducing at least one heterologous nucleic acid molecule into the chloroplasts. The heterologous nucleic acid is selected such that it is integratable into the chloroplast's genome via homologous recombination which is readily effected by enzymes inherent to the chloroplast. To this end, the heterologous nucleic acid includes, in addition to a gene of interest, at least one nucleic acid sequence that is derived from the chloroplast's genome. In addition, the heterologous nucleic acid typically includes a selectable marker. Further details relating to this technique are found in U.S. Patent. Nos. 4,945,050 and 5,693,507 which are incorporated herein by reference. A polypeptide can thus be produced by the protein expression system of the chloroplast.

[0403] U.S. Patent No. 7,135,620 (issued November 14, 2006 to Daniell et al.; incorporated herein by reference) describes chloroplast expression vectors and related methods. Expression cassettes are DNA constructs including a coding sequence and appropriate control sequences to provide for proper expression of the coding sequence in the chloroplast. Typical expression cassettes include the following components: the 5' untranslated region from a microorganism gene or chloroplast gene such as psbA which will provide for transcription and translation of a DNA sequence encoding a polypeptide of interest in the chloroplast; a DNA sequence encoding a polypeptide of interest; and a translational and transcriptional termination region, such as a 3' inverted repeat region of a chloroplast gene

that can stabilize RNA of introduced genes, thereby enhancing foreign gene expression. The cassette can optionally include an antibiotic resistance gene.

[0404] Typically, the expression cassette is flanked by convenient restriction sites for insertion into an appropriate genome. The expression cassette can be flanked by DNA sequences from chloroplast DNA to facilitate stable integration of the expression cassette into the chloroplast genome, particularly by homologous recombination. Alternatively, the expression cassette may remain unintegrated, in which case, the expression cassette typically includes a chloroplast origin of replication, which is capable of providing for replication of the heterologous DNA in the chloroplast.

[0405] The expression cassette generally includes a promoter region from a gene capable of expression in the chloroplast. The promoter region may include promoters obtainable from chloroplast genes, such as the psbA gene from spinach or pea, or the rbcL and atpB promoter region from maize and Rrna promoters. Examples of promoters are described in Hanley-Bowdoin and 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; and Zurawski et al., Proc. Nat'l Acad Sci. U.S.A. (1982) 79: 7699 7703. Other promoters can be identified and the relative strength of promoters so identified evaluated, by placing a promoter of interest 5' to a promoterless marker gene and observing its effectiveness relative to transcription obtained from, for example, the promoter from the psbA gene, a relatively strong chloroplast promoter. The efficiency of heterologus gene expression additionally can be enhanced by any of a variety of techniques. These include the use of multiple promoters inserted in tandem 5' to the heterologous gente, for example a double psbA promoter, the addition of enhancer sequences and the like.

[0406] Numerous promoters active in the *Chlorella* chloroplast can be used for expression of exogenous genes in the *Chlorella* chloroplast, such as those found in GenBank accession number NC_001865 (*Chlorella vulgaris* chloroplast, complete genome),

[0407] Where it is desired to provide for inducible expression of the heterologous gene, an inducible promoter and/or a 5' untranslated region containing sequences which provide for regulation at the level of transcription and/or translation (at the 3' end) may be included in the expression cassette. For example, the 5' untranslated region can be from a gene wherein expression is regulatable by light. Similarly, 3' inverted repeat regions could be used to

stabilize RNA of heterologous genes. Inducible genes may be identified by enhanced expression in response to a particular stimulus of interest and low or absent expression in the absence of the stimulus. For example, a light-inducible gene can be identified where enhanced expression occurs during irradiation with light, while substantially reduced expression or no expression occurs in low or no light. Light regulated promoters from green microalgae are known (see for example Mol Genet Genomics. 2005 Dec;274(6):625-36).

[0408] The termination region which is employed will be primarily one of convenience, since the termination region appears to be relatively interchangeable among chloroplasts and bacteria. The termination region may be native to the transcriptional initiation region, may be native to the DNA sequence of interest, or may be obtainable from another source. See, for example, Chen and Orozco, Nucleic Acids Res. (1988) 16:8411.

[0409] The expression cassettes may be transformed into a plant cell of interest by any of a number of methods. These methods include, for example, biolistic methods (See, for example, Sanford, Trends In Biotech. (1988) 6:299 302, U.S. Patent No. 4,945,050; electroporation (Fromm et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) (1985) 82:5824 5828); use of a laser beam, microinjection or any other method capable of introducing DNA into a chloroplast.

[0410] Additional descriptions of chloroplast expression vectors suitable for use in microorganisms such as microalgae are found in U.S. Patent Nos. 7,081,567 (issued July 25, 2006 to Xue et al.); 6,680,426 (issued January 20, 2004 to Daniell et al.); and 5,693,507 (issued December 2, 1997 to Daniell et al.).

[0411] Proteins expressed in the nuclear genome of *Chlorella* can be targeted to the chloroplast using chloroplast targeting signals. Chloroplast targeting sequences endogenous to *Chlorella* are known, such as genes in the Chlorella nuclear genome that encode proteins that are targeted to the chloroplast; see for example GenBank Accession numbers AY646197 and AF499684. Proteins can also be expressed in the *Chlorella* chloroplast by insertion of genes directly into the chloroplast genome. Chloroplast transformation typically occurs through homologous recombination, and can be performed if chloroplast genome sequences are known for creation of targeting vectors (see for example the complete genome sequence of a *Chlorella* chloroplast; Genbank accession number NC_001865). See previous sections herein for details of chloroplast transformation.

2. Expression in Mitochondria

[0412] In another embodiment of the present invention, the expression of a polypeptide in a microorganism is targeted to mitochondria. Methods for targeting foreign gene products into mitochnodria (Boutry et al. Nature (London) (1987) 328:340 342) have been described, including in green microalgae (see for example Mol Gen Genet. 1993 Jan;236(2-3):235-44).

[0413] For example, an expression vector encoding a suitable secretion signal can target a heterologus protein to the mitochondrion. The IMPACTVECTOR1.5 vector, from Wageningen UR- Plant Research International, uses the yeast CoxIV secretion signal, which was shown to deliver proteins in the mitochondrial matrix. The protein is fused to the first 4 amino acids of the yeast CoxIV protein in order to allow proper processing of the signal peptide (Kohler et al. Plant J 11: 613-621 (1997)). Other mitochondrial targeting sequences are known, including those functional in green microalgae. For example, see FEBS Lett. 1990 Jan 29;260(2):165-8; and J Biol Chem. 2002 Feb 22;277(8):6051-8.

[0414] Proteins expressed in the nuclear genome of *Chlorella* can be targeted to the mitochondria using mitochondrial targeting signals. See previous sections herein for details of mitochondrial protein targeting and transformation.

3. Expression in Endoplasmic Reticulum

[0415] In another embodiment of the present invention, the expression of a polypeptide in a microorganism is targeted to the endoplasmic reticulum. The inclusion of an appropriate retention or sorting signal in an expression vector ensure that proteins are retained in the endoplasmic reticulum (ER) and do not go downstream into Golgi. For example, the IMPACTVECTOR1.3 vector, from Wageningen UR- Plant Research International, includes the well known KDEL retention or sorting signal. With this vector, ER retention has a practical advantage in that it has been reported to improve expression levels 5-fold or more. The main reason for this appears to be that the ER contains lower concentrations and/or different proteases responsible for post-translational degradation of expressed proteins than are present in the cytoplasm. ER retention signals functional in green microalgae are known. For example, see Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):6225-30.

G. Transformation

[0416] Cells can be transformed by any suitable technique including, e.g., biolistics, electroporation, glass bead transformation and silicon carbide whisker transformation. See, e.g., Examples herein.

[0417] Any convenient technique for introducing a transgene into *Chorella* can be employed in the present invention. Dawson et al. (1997) (supra) described the use of micro-projectile bombardment to introduce the nitrate reductase (NR) gene from *Chlorella vulgaris* into NR-deficient *Chlorella sorokiniana* mutants, resulting in stable transformants. Briefly, 0.4 micron tungsten beads were coated with plasmid; 3 X 10^7 *C. sorokiniana* cells were spread in the center third of a non-selective agar plate and bombarded with the PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery® system (Bio-Rad).

[0418] A preferred method for introducing a transgene into *Chlorella* is the method described by Kim et al. (2002), *Mar. Biotechnol.* 4:63-73. Kim reports the transformation of *Chorella ellipsoidea* protoplasts using $CaCl_2$ and polyethylene glycol (PEG). In particular, protoplasts were prepared by growing *C. ellipsoidea* cells to a density of 1-2 X 10^8/Ml. Cells were recovered and washed by centrifugation for 5 minutes at 1600 g and resuspended in 5 Ml of phosphate buffer (Ph 6.0) containing 0.6 M sorbitol, 0.6 M mannitol, 4% (weight/volume) cellulose (Calbiochem), 2% (weight/volume) macerase (Calbiochem), and 50 units pectinase (Sigma). The cell suspension was incubated at 25°C for 16 hours in the dark with gentle shaking. The resultant protoplasts were recovered by centrifugation at 400 g for 5 minutes. The pellet was gently resuspended in 5 Ml of f/2 medium containing 0.6 M sorbitol and 0.6 M mannitol and centrifuged at 400 g for 5 minutes. This pellet was resuspended in 1 Ml of 0.6 M sorbitol/mannitol solution containing 50 mM$CaCl_2$. Then, 5 mg of transgene DNA was added, along with 25 μg calf thymus DNA (Sigma), to 10^7-10^8 protoplasts in 0.4 Ml. After 15 minutes at room temperature, 200 μL of PNC (40% polyethylene glycol 4000, 0.8 M NaCl, 50 Mm $CaCl_2$) was added and mixed gently for 30 minutes at room temperature. After this, 0.6 Ml of f/2 medium supplemented with 0.6 M sorbitol/mannitol solution, 1% yeast extract and 1% glucose was added, and the transformed cells were incubated at 25°C for 12 hours in the dark for cell wall regeneration. A similar method was used by Huang et al. (2007) (supra) to introduce a transgene encoding mercuric reductase into *Chlorella sp. DT.*

[0419] Electorporation has also been employed to transform *Chorella*. As reported by Maruyama et al. (2004), Biotechnology Techniques 8:821-826 (incorporated by reference herein in its entirety), this technique was used to introduce a transgene into protoplasts of *Chlorella saccharophila* c-211-1a prepared from the cells in the stationary phase. Transient expression of the introduced plasmid was observed under a field strength of between 600 and

900 V/cm, and a pulse duration of around 400 ms, where high membrane permeability to 70-kDa FITC-dextran was ascertained.

[0420] Examples of expression of transgenes in *Chlorella* can be found in the literature (see for example 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)). Also see Examples herein.

[0421] Examples of expression of transgenes in oleaginous yeast (e.g., *Yarrowia lipolytica*) can be found in the literature (see, for example, Bordes et al., J Microbiol Methods, Jun 27 (2007)). Examples of expression of transgenes in fungi (e.g., *Mortierella alpine*, *Mucor circinelloides*, and *Aspergillus ochraceus*) can also be found in the literature (see, for example, Microbiology, Jul; 153(Pt. 7):2013-25 (2007); Mol 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); and PCT/JP2004/012021). Examples of expression of exogenous genes in bacteria such as *E. coli* are well known; see for example Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press.

[0422] Vectors for transformation of microorganisms in accordance with the present invention can be prepared by known techniques familiar to those skilled in the art. The nucleotide sequence of the construct used for transformation of multiple *Chlorella* species corresponds to SEQ ID NO:25. In one embodiment, an exemplary vector design for expression of a lipase gene in a microorganism such as a microalgae contains a gene encoding a lipase in operable linkage with a promoter active in microalgae. Alternatively, if the vector does not contain a promoter in operable linkage with the gene of interest, the gene can be transformed into the cells such that it becomes operably linked to an endogenous promoter at the point of vector integration. The promoterless method of transformation has been proven to work in microalgae (see for example Plant Journal 14:4, (1998), pp.441-447). The vector can also contain a second gene that encodes a protein that, e.g., imparts resistance to an antibiotic or herbicide, i.e., a selectable marker. Optionally, one or both gene(s) is/are

followed by a 3' untranslated sequence containing a polyadenylation signal. Expression cassettes encoding the two genes can be physically linked in the vector or on separate vectors. Co-transformation of microalgae can also be used, in which distinct vector molecules are simultaneously used to transform cells (see for example Protist 2004 Dec;155(4):381-93). The transformed cells can be optionally selected based upon the ability to grow in the presence of the antibiotic or other selectable marker under conditions in which cells lacking the resistance cassette would not grow.

[0423] All references cited herein, including patents, patent applications, and publications, are hereby incorporated by reference in their entireties, whether previously specifically incorporated or not. The publications mentioned herein are cited for the purpose of describing and disclosing reagents, methodologies and concepts that may be used in connection with the present invention. Nothing herein is to be construed as an admission that these references are prior art in relation to the inventions described herein.

[0424] Although this invention has been described in connection with specific embodiments thereof, it will be understood that it is capable of further modifications. This application is intended to cover any variations, uses, or adaptations of the invention following, in general, the principles of the invention and including such departures from the present disclosure as come within known or customary practice within the art to which the invention pertains and as may be applied to the essential features hereinbefore set forth.

X. EXAMPLES

[0425] The following examples are offered to illustrate, but not to limit, the claimed invention.

EXAMPLE 1

[0426] *Chlorella* strains from the University of Texas culture collection were tested for growth on glycerol and glucose. The following *Chlorella* species and strains were cultured: *Chlorella kessleri* (strains 263, 397, 398, 2228); *Chlorella sorokiniana* (strains 1663, 1665, 1669, 1671, 1810); *Chlorella saccharophila* (2911; 2469); *Chlorella protothecoides* (31, 249, 250, 264). Each strain was inoculated from solid media into 25 ml liquid base media (2g/L yeast extract, 2.94mM $NaNO_3$, 0.17mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.4mM K_2HPO_4, 1.28mM KH_2PO_4, 0.43mM NaCl) and grown shaking at 27C for 72 hours under a light intensity of 75$\mu Em^{-2}s^{-1}$. These cultures were used to inoculate each strain to a final density of $1x10^5$ cells per ml into 24-well plates containing 2ml of (a) base media only; (b)

base media plus 0.1% glucose; and (c) base media plus 0.5% reagent grade glycerol (EM Science, catalog #GX0185-6). Plates were placed in the dark and grown for 72 hours shaking at 27C. Samples of each strain grown in the three conditions were diluted 1.9:1 in distilled H2O and absorbance was read at 600nm in a Molecular Devices SpectraMax 340PC. All strains exhibited growth in the presence of glucose and glycerol compared to only base media.

EXAMPLE 2

[0427] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #2 (STRAIN 264) and *Chlorella kessleri* #1 (STRAIN 398) were obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium. Modified Proteose medium consisted (g/L) of 0.25 g $NaNO_3$, 0.09g K_2HPO_4, 0.175 g KH_2PO_4 0.025 g, 0.025 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.075 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 2 g yeast extract per liter. Glycerol wastes from biodiesel production (acidulated glycerol (AG) and non-acidulated glycerol (NAG)) were obtained from Imperial Western Products (Selma, CA, USA). "Pure" or "reagent grade" glycerol was from EM Science (a division of Merck KGA), catalog #GX0185-6.

[0428] Experimental design and Growth Measurement: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 1 % pure glycerol
2. Proteose + 1% acidulated glycerol
3. Proteose + 1% non-acidulated glycerol
4. Proteose + 1 % pure glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)
5. Proteose + 1% acidulated glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)
6. Proteose + 1% non-acidulated glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)

[0429] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and were agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% (w/v) glucose was added to samples #4, 5, and 6 and cultured another 24 hr. To measure dry cell weight, 1 ml of each culture was pelleted by centrifugation at 5,000 rpm for 5 min in an Eppendorf 5415C centrifuge. After removing supernatant, cell pellets were frozen at -80 °C and lyophilized in a lab scale freeze dryer (Labconco, MO, USA). Results are shown in Figure 1.

EXAMPLE 3

[0430] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #3 (STRAIN 249) and *Chlorella kessleri* #2 (strain 397) were obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2).

[0431] Experimental design and Growth Measurement: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 1 % pure glycerol +1 % glucose
2. Proteose + 1% acidulated glycerol +1 % glucose
3. Proteose + 1% non-acidulated glycerol +1 % glucose

[0432] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr, cell growth was measured for dry cell weight (see EXAMPLE 2). Results are shown in Figure 2.

EXAMPLE 4

[0433] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #3 (STRAIN 249), #4 (STRAIN 31), and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) were obtained from the Culture Collection of Alga at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2)

[0434] Experimental design and lipid assay: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 1 % pure glycerol +1 % glucose
2. Proteose + 1% acidulated glycerol +1 % glucose
3. Proteose + 1% non-acidulated glycerol +1 % glucose

[0435] Each strain was inoculated to media containing different glycerols (pure, acidulated, or non-acidulated) to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr, lipid contents were measured. To measure the amount of lipid content in cells, 100 µl of cultures were collected and washed once with same volume of media. To each tube, 5 µl of washed cells and 200 µl of sulfuric acid 18 M were added. The tubes were incubated at 90°C in a water bath for 30 min, and 1 ml of phosphoric acid–vanillin reagent was added to the tubes and incubated at 37°C for 15 min. To prepare the phosphoric acid–vanillin reagent, 0.12 g of

vanillin was added to 20 ml of water, and the volume adjusted to 100 ml with 85% phosphoric acid. The optical density at 530 nm was read in a glass cuvette against a reference tube with 5 µl water as sample. Results are shown in Figure 3.

EXAMPLE 5

[0436] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #2 (STRAIN 264) and *Chlorella kessleri* #1 (STRAIN 398) were obtained from the Culture Collection of Alga at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2).

[0437] Experimental design and lipid assay: For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 1 % pure glycerol
2. Proteose + 1 % non-acidulated glycerol
3. Proteose + 1 % pure glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)
4. Proteose + 1 % non-acidulated glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)

[0438] Each strain was inoculated to media containing different glycerols (pure or non-acidulated) to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% glucose was added to sample #3 and #4 and cultured another 24 hr. Lipid contents were measured in all samples (see EXAMPLE 4). The optical density at 600 nm was also measured to check for non-specific absorbance and subtracted from O.D. 530 nm to calculate the amount of lipid. The reference curve is composed of Triolein dissolved in chloroform ranging from 1 to 10 µg. Results are shown in Figure 4.

EXAMPLE 6

[0439] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #3 (STRAIN 249) and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) were obtained from the Culture Collection of Alga at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2).

[0440] Experimental design and lipid assay: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 1 % pure glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)
2. Proteose + 1 % acidulated glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)
3. Proteose + 1 % non-acidulated glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)

[0441] Each strain was inoculated to media containing different glycerols (pure, acidulated, or non-acidulated) to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% glucose was added and cultured another 24 hr. Dried cell-weight and lipid content were measured in all samples (see EXAMPLES 2 and 5). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by dried cell weight. Results are shown in Figure 5.

EXAMPLE 7

[0442] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #2 (STRAIN 264) and *Chlorella kessleri* #1 (STRAIN 398) were obtained from the Culture Collection of Alga at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2).

[0443] Experimental design and lipid assay: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 1 % pure glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)
2. Proteose + 1 % non-acidulated glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)

[0444] Each strain was inoculated media containing either 1 % pure or 1 % non-acidulated glycerol to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% glucose was added and cultured another 24 hr. Dried cell-weight and lipid content were measured in all samples (see EXAMPLE 1 and 4). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by dried cell weight. Results are shown in Figure 6.

EXAMPLE 8

[0445] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #4 (STRAIN 31) and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) were obtained from the Culture Collection of Alga at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2)

[0446] Experimental design and lipid assay: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 2 % glucose
2. Proteose + 1 % glycerol + 1 % glucose

[0447] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr of initial growth, lipid contents were measured (see EXAMPLE 5). Results are shown in Figure 7.

EXAMPLE 9

[0448] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #3 (STRAIN 249), #4 (STRAIN 31) and *Chlorella kessleri* #1 (STRAIN 398) were obtained from the Culture Collection of Alga at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2).

[0449] Experimental design and lipid assay: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 2% glucose
2. Proteose + 1% glycerol + 1% glucose
3. Proteose + 1% glycerol + 1% glucose (added after 72 hr)

[0450] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% (w/v) glucose was added to #3 media and cultured another 24 hr. Dried cell-weight and lipid contents were measured in all samples (see EXAMPLES 2 and 5). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by dried cell weight. Results are shown in Figure 8.

EXAMPLE 10

[0451] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #3 (STRAIN 249), and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) were obtained from the Culture Collection of Alga at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2).

[0452] Experimental design and lipid assay: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 1% pure glycerol + 1% glucose
2. Proteose + 1% pure glycerol + 1% glucose (added after 72 hr)
3. Proteose + 1% acidulated glycerol + 1% glucose
4. Proteose + 1% acidulated glycerol + 1% glucose (added after 72 hr)
5. Proteose + 1% non-acidulated glycerol + 1% glucose

6. Proteose + 1% non-acidulated glycerol + 1% glucose (added after 72 hr)

[0453] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% (w/v) glucose was added to #2, #4, and #6 media and cultured another 24 hr. Lipid contents were measured in all samples (see EXAMPLE 4). Results are shown in Figure 9.

EXAMPLE 11

[0454] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #3 (STRAIN 249), #4 (STRAIN 31) and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) were obtained from the Culture Collection of Alga at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2).

[0455] Experimental design and lipid assay: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose + 1% pure glycerol + 1% glucose
2. Proteose + 1% pure glycerol + 1% glucose (added after 72 hr)
3. Proteose + 1% acidulated glycerol + 1% glucose
4. Proteose + 1% acidulated glycerol + 1% glucose (added after 72 hr)
5. Proteose + 1% non acidulated glycerol + 1% glucose
6. Proteose + 1% non acidulated glycerol + 1% glucose (added after 72 hr)

[0456] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% (w/v) glucose was added to #2, #4, and #6 media and cultured another 24 hr. Dried cell-weight was measured in all samples (see EXAMPLE 2). Results are shown in Figure 10.

EXAMPLE 12

Vector construction

[0457] A BamHI-SacII fragment containing the CMV promoter, a hygromycin resistance cDNA, and a CMV 3' UTR (SEQ ID NO:5, a subsequence of the pCAMBIA1380 vector, Cambia, Canberra, Australia) was cloned into the BamHI and SacII sites of pBluescript and is referred to herein as pHyg.

Biolistic transformation of Chlorella

[0458] S550d gold carriers from Seashell Technology were prepared according to the protocol from manufacturer. Linearized pHyg plasmid (20 μg) was mixed with 50 μl of binding buffer and 60 μl (30 mg) of S550d gold carriers and incubated in ice for 1 min. Precipitation buffer (100 μl) was added, and the mixture was incubated in ice for another 1 min. After vortexing, DNA-coated particles were pelleted by spinning at 10,000 rpm in an Eppendorf 5415C microfuge for 10 seconds. The gold pellet was washed once with 500 μl of cold 100% ethanol, pelleted by brief spinning in the microfuge, and resuspended with 50 μl of ice-cold ethanol. After a brief (1-2 sec) sonication, 10 μl of DNA-coated particles were immediately transferred to the carrier membrane.

[0459] *Chlorella protothecoides* culture (Univeristy of Texas Culture Collection 250) was grown in proteose medium (2g/L yeast extract, 2.94mM NaNO3, 0.17mM CaCl2•2H2O, 0.3mM MgSO4•7H2O, 0.4mM K2HPO4, 1.28mM KH2PO4, 0.43mM NaCl) on a gyratory shaker under continuous light at 75 μmol photons m^{-2} sec^{-1} until it reached a cell density of $2x10^6$cells/ml. The cells were harvested, washed once with sterile distilled water, and resuspended in 50 μl of medium. 1 x 10^7 cells were spread in the center third of a non-selective proteose media plate. The cells were bombarded with the PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery system (Bio-Rad). Rupture disks (1100 and 1350 psi) were used, and the plates were placed 9 and 12 cm below the screen/macrocarrier assembly. The cells were allowed to recover at 25°C for 12–24 h. Upon recovery, the cells were scraped from the plates with a rubber spatula, mixed with 100 μl of medium and spread on hygromycin contained plates (200 μg/ml). After 7-10 days of incubation at 25°C, colonies representing transformed cells were visible on the plates from 1100 and 1350 psi rupture discs and from 9 and 12 cm distances. Colonies were picked and spotted on selective agar plates for a second round of selection.

Transformation of *Chlorella* by Electroporation

[0460] *Chlorella protothecoides* culture was grown in proteose medium on a gyratory shaker under continuous light at 75 μmol photons m^{-2} sec^{-1} until it reached a cell density of of $2x10^6$cells/ml. The cells were harvested, washed once with sterile distilled water, and resuspended in a tris-phosphate buffer (20m M Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM potassium phosphate) containing 50 mM sucrose to a density of $4x10^8$cells/ml. About 250 μl cell suspension ($1x10^8$cells) was placed in a disposable electroporation cuvette of 4 mm gap. To the cell suspension, 5 μg of linearized pHyg plasmid DNA and 200 μg of carrier DNA

(sheared salmon sperm DNA) was added. The electroporation cuvette was then incubated in a water bath at 16°C for 10 minutes. An electrical pulse (1100 V/cm) was then applied to the cuvette at a capacitance of 25 μF (no shunt resistor was used for the electroporation) using a Gene Pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) electroporation apparatus. The cuvette was then incubated at room temperature for 5 minutes, following which the cell suspension was transferred to 50 ml of proteose media, and shaken on a gyratory shaker for 2 days. Following recovery, the cells were harvested by centrifugation at low speed, resuspended in proteose media, and plated at low density on plates supplemented with 200 μg/ ml hygromycin. The plates were incubated under continuous light at 75 μmol photons m^{-2} sec^{-1}. Transformants appeared as colonies in 1 – 2 weeks. Colonies were picked and spotted on selective agar plates for a second round of selection.

Genotyping

[0461] A subset of colonies that survived a second round of selection were cultured in small volume and harvested. Pellets of approximately 5-10 uL volume were resuspended in 50 uL of 10mM NaEDTA by vortexing and then incubated at 100°C for 10. The tubes were then vortexed briefly and sonicated for 10 seconds, then centifuged at 12,000 x g for 1 minute. 2 uL of supernatant as template was used in a 50 uL PCR reaction. Primers used for genotyping were SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7. PCR conditions were as follows: 95°C 5 min x 1 cycle; 95°C 30 sec - 58°C 30 sec - 72°C 1 min 30 sec x 35 cycles; 72°C 10 min x 1 cycle. The expected 992 bp fragment was found in 6 of 10 colonies from the biolistic method and from a single electroporation colony. A lower sized, nonspecific band was present in all lanes. Results are shown in Figure 16. To confirm the identity of the amplified 992bp fragment, two biolistic bands and the electroporation band were excised from the gel and individually sequenced. The sequence of all three bands corresponded to the expected 992 bp fragment. (DNA ladder: Bionexus® All Purpose Hi-Lo® DNA ladder catalog # BN2050).

EXAMPLE 13

[0462] Strains and Media: (a) *Spirulina platensis* (UTEX 2340) and (b) *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) were obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock culture of *Spirulina* was maintained in Spirulina medium and *Navicula* was maintained in soil extract medium (SEM). Spirulina medium consisted of 162 mM $NaHCO_3$, 38 mM Na_2CO_3, 1.9 mM K_2HPO_4, 29 mM $NaNO_3$, 5.75 mM K_2SO_4, 17.1 mM NaCl, 0.8 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 mM Na_2EDTA, 0.36 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.21 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.037 mM $ZnCl_2$, 0.0085 mM $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.017

mM $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.78 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.15 μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 μM H_3BO_3, and 0.001 mM Vitamin B_{12}. Soil extract medium consisted of 2.94 mM $NaNO_3$, 0.17 mM$CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.43 mM K_2HPO_4, 1.29 mM KH_2PO_4, 0.43 mM NaCl, and soil extract. Glycerol wastes from biodiesel production (acidulated glycerol (AG) and non-acidulated glycerol (NAG)) were obtained from Imperial Western Products (Selma, CA, USA).

[0463] Experimental Design and Growth Measurement: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

(a)

7. Spirulina medium + 2% glucose
8. Spirulina medium + 2% reagent grade glycerol
9. Spirulina medium + 2% non-acidulated glycerol
10. Spirulina medium + 1% non-acidulated glycerol + 1 % glucose

(b)

1. SEM + 2% glucose
2. SEM + 2% reagent grade glycerol
3. SEM + 1% reagent grade glycerol + 1 % glucose
4. SEM + 2% acidulated glycerol
5. SEM + 1% acidulated glycerol + 1 % glucose
6. SEM + 2% non-acidulated glycerol
7. SEM + 1% non-acidulated glycerol + 1 % glucose

[0464] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr, lipid contents were measured. To measure the amount of lipid content in cells, 100 μl of cultures were collected and washed once with same volume of media. To each tube, 5 μl of washed cells and 200 μl of sulfuric acid 18 M were added. The tubes were incubated at 90 °C water bath for 30 min, and 1 ml of phosphoric acid–vanillin reagent were added to the tubes and incubated at 37 °C for 15 min. To prepare the phosphoric acid–vanillin reagent, 0.12 g of vanillin was added to 20 ml of water, and the volume adjusted to 100 ml with 85% phosphoric acid. The optical density at 530 nm was read in a glass cuvette against a reference tube with 5 μl water as sample. The reference curve is composed of Triolein dissolved in chloroform ranging from 1 to 10 μg.

[0465] To measure dried cell-weight, 0.5 ml of each culture was pelleted by centrifugation at 5000 rpm for 5 min. After removing supernatant, cell pellets were frozen at -80 °C and dried overnight in a Freeze Dry system (Labconco, MO, USA). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by dried cell weight. Results are shown in Figure 11.

EXAMPLE 14

[0466] Strains and Media: *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) was obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium. Modified Proteose medium consisted (g/L) of 0.25 g $NaNO_3$, 0.09g K_2HPO_4, 0.175 g KH_2PO_4 0.025 g, 0.025 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.075 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 2 g yeast extract per liter.

[0467] Experimental design and Growth and lipid measurement: For each growth condition, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

(a), (b)

1. Proteose + 2% glucose
2. Proteose + 2% glycerol
3. Proteose + 2% acidulated glycerol
4. Proteose + 2% non-acidulated glycerol
5. Proteose + 1% non-acidulated glycerol + 1 % glucose

[0468] *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr, cell growth was measured by dried cell-weight, and lipid content was measured by phosphor-vanillin assay. (see EXAMPLE 13). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by dried cell weight. Results are shown in Figure 12.

EXAMPLE 15

[0469] Strains and Media: *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) was obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on soil extract medium (see EXAMPLE 13)

[0470] Experimental design and growth measurement: For each growth condition, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. SEM + 2% glucose
2. SEM + 2% glycerol
3. SEM + 2% acidulated glycerol
4. SEM + 1% acidulated glycerol + 1 % glucose
5. SEM + 2% non-acidulated glycerol
6. SEM + 1% non-acidulated glycerol + 1 % glucose

Navicula pelliculosa (UTEX 667) was inoculated to media containing glucose or different glycerols (pure, acidulated, or non-acidulated) to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr, cell growth was measured by dried cell-weight (see EXAMPLE 13). Results are shown in figure 13.

EXAMPLE 16

[0471] Strains and Media: *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) and *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) were obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium for *Scenedesmus armatus* and soil extract medium for *Navicula pelliculosa* (see EXAMPLE 1).

[0472] Experimental design and growth measurement: For each strain, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

Scenedesmus armatus

5. Proteose + 1 % acidulated glycerol + 1 % glucose
6. Proteose + 1 % acidulated glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)

Navicula pelliculosa

1. SEM + 1 % acidulated glycerol + 1 % glucose
2. SEM + 1 % acidulated glycerol + 1 % glucose (added after 72 hr)

[0473] Each strain was inoculated to media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% glucose was added to sample #2 and cultured another 24 hr. Cell growth was measured by dried cell-weight (see EXAMPLE 13). Results are shown in figure 14.

EXAMPLE 17

[0474] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) was obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 1)

[0475] Experimental design: For each condition, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

4. Proteose
5. Proteose + 0.5 % glucose
6. Proteose + 0.5 % xylose
7. Proteose + 0.25 % glucose + 0.25 % xylose

[0476] *Chlorella protothecoides #4* (UTEX 31) was inoculated to media containing different sugars (glucose, or xylose) to 3 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of growth, cell growth was measured by counting cell numbers of each culture. Results are shown in figure 15.

EXAMPLE 18

[0477] *Chlorella protothecoides* strains #1, #3, and #4 were obtained from the Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 1). For each condition, 1 ml of following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose
2. Proteose + 1 % glucose
3. Proteose + 1 % fructose

[0478] Each strain was inoculated to media containing different sugars (glucose, or fructose) to 1 x 10^6 cells/ml concentration. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr of growth, cell density was measured by counting cell numbers of each culture. Results are shown in figure 20.

EXAMPLE 19

Chlorella on Sucrose

[0479] Materials and Methods: *Chlorella protothecoides* (UTEX 249) was inoculated into three 50ml flasks of Proteose media with 1% sucrose (2.94mM $NaNO_3$, 0.428mM K_2HPO_4, 1.28mM KH_2PO_4, 0.427mM NaCl, 0.17mM $CaCl_2$-$2H_2O$, 0.3mM $MgSO_4$-$7H_2O$, proteose peptone 1 g/L) to a final cell density of 4x10^5 cells per ml. Invertase (Sigma #I4504) was

added to two of the cultures at 0.01U/ml and 0.05U/ml. All three cultures were grown in the dark for ~60hrs shaking at 150rpm.

[0480] Results: Final cell counts were performed on all three cultures after ~60hrs of shaking in the dark. The control flask reached $4.4x10^5$ cells per ml while the 0.01U/ml and 0.05U/ml flasks reached cell densities of $1x10^8$ and $3x10^8$ respectively. Each flask was checked for contamination at the end of the experiment by microscopic analysis and all were clean.

EXAMPLE 20

Chlorella strains growing on sucrose

[0481] Cultures of *Chlorella kessleri* ((a) UTEX 397 and (b) UTEX 398) and *Chlorella fusca* ((a) UTEX 251 and (b) UTEX 1801) were inoculated from autotrophic liquid cultures into 10ml of Proteose + 1% sucrose media in 50 ml flasks at 1 x 10^6 cells/ml. Control cultures were also inoculated at the same density with only Proteose media. Cultures were grown at 28°C in the dark shaking at 250 rpm for 7 days, at which point cell density was measured by hemocytometer. As shown in Figures 21-22, all four strains grew on sucrose compared to the initial cell density and the proteose-only control.

EXAMPLE 21

Chlorella protothecoides Growth on Molasses with a Sucrose Invertase

[0482] Preparation of *Chlorella* cells for Inoculation: A 10 ml liquid culture of *Chlorella* was started taking the inoculum from a solid Proteose plate. The cultures were grown in light for approximately 2 days at 26°C. Growth was measured using an optical densitomer (OD) at 750 nm and by determining dry cell weights.

[0483] Preparation of Molasses and Sugar Stock Solutions: A 5% stock solution was prepared with glucose, sucrose and three different molasses samples (labeled BS1, BS2 and HTM) obtainted from the commercial processing of sugarcane into sugar, as shown in the following Table 13. The pH of all stocks was verified to be in the range of 6-6.6, and the stocks were then autoclaved.

[0484] Table 13. Molasses and sugar solutions.

Molasses	% Sugar	5% sugar dil.in 100mls
		grams or mls
HTM	78.72	6.4
BS1 (FL)	44.25	11.3

BS2 (AU)	51.55	9.7
Sucrose	100	5
Glucose	100	5

[0485] Preparation of Invertase Solution: A 40 units/ml stock solution of invertase was prepared by reconstituting 1 mg of a 400 unit/mg Invertase (Sigma) in 10 milliliters of distilled water.

[0486] Experimental Conditions and Setup: 10 ml cultures were prepared, each consisting of 1% final molasses/sugar concentration, 0.05 units/ml Invertase, and 1.0x 10^6 cells per ml of *Chlorella protothecoides* in a base Protease media. The cultures were numbered as follows: (1) media only control; (2) 1% HTM; (3) 1% BS1; (4) 1% BS2; (5) 1% glucose; and (6) 1% sucrose. A similar control set was also prepared without the addition of Invertase. The cultures were grown in darkness for five days shaking at 250 rpm at 28°C.

[0487] Results: Growth of the *Chlorella protothecoides* cells was evaluated following the five days of incubation on the respective feedstock in darkness. As shown in Figures 23-24, the cells can be grown on molasses in the presence of a sucrose invertase with yields comparable to that of growth on pure reagent-grade glucose.

EXAMPLE 22

Genetic Engineering of *Chlorella protothecoides* to Express an Exogenous Sucrose Invertase

[0488] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) was obtained from the Culture Collection of Alga at the University of Texas (Austin, TX, USA). The stock cultures were maintained on modified Proteose medium. Modified Proteose medium consists of 0.25 g $NaNO_3$, 0.09 g K_2HPO_4, 0.175 g KH_2PO_4 0.025 g, 0.025 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.075 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 2 g yeast extract per liter (g/L).

[0489] Plasmid Construction: To express the secreted form of invertase in *Chlorella protothecoides*, a *Saccharomyces cerevisiae SUC2* gene was placed under the control of three different promoters: Cauliflower mosaic virus 35S promoter (CMV), Chlorella virus promoter (NC-1A), and Chlorella HUP1 promoter. A yeast SUC2 gene was synthesized to accomodate codon usage optimized for *C. protothecoides* and includes a signal sequence required for directing extracellular secretion of invertase. Each construct was built in pBluescript KS+, and EcoRI/AscI, AscI/XhoI, and XhoI/BamHI sites were introduced to each promoter, invertase gene, and CMV 3'UTR, respectively, by PCR ampilication using

specific primers. Purified PCR products were cloned sequentially. An illustration of the final constructs is shown in Figure 25.

[0490] Transformation of *Chlorella protothecoides*: A *Chlorella protothecoides* culture was grown in modified Proteose medium on a gyratory shaker under continuous light at 75 μmol photons m^{-2} sec^{-1} till it reached a cell density of of $6x10^6$cells/ml.

[0491] For biolistic transformation, S550d gold carriers from Seashell Technology were prepared according to the protocol from the manufacturer. Briefly, a linearized construct (20 μg) by BsaI was mixed with 50 μl of binding buffer and 60 μl (3 mg) of S550d gold carriers and incubated in ice for 1 min. Precipitation buffer (100 μl) was added, and the mixture was incubated in ice for another 1 min. After mild vortexing, DNA-coated particles were pelleted by spinning at 10,000 rpm in an Eppendorf microfuge for 10 seconds. The gold pellet was washed once with 500 μl of cold 100% ethanol, pelleted by brief spinning in the microfuge, and resuspended with 50 μl of ice-cold ethanol. After a brief (1-2 sec) sonication, 10 μl of DNA-coated particles were immediately transferred to the carrier membrane. The cells were harvested, washed once with sterile distilled water, resuspended in 50 μl of medium (1×10^7 cells), and were spread in the center third of a non-selective Proteous plate. The cells were bombarded with the PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery system (Bio-Rad). Rupture disks (1100 and 1350 psi) were used, and the plates were placed 9-12 cm below the screen/macrocarrier assembly. The cells were allowed to recover at 25°C for 12–24 hours. Upon recovery, the cells were scraped from the plates with a rubber spatula, mixed with 100 μl of medium and spread on modified Proteose plates with 1% sucrose. After 7-10 days of incubation at 25°C in the dark, colonies representing transformed cells were visible on the plates.

[0492] For transformation with electroporation, cells were harvested, washed once with sterile distilled water, and resuspended in a Tris- phosphate buffer (20m M Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM potassium phosphate) containing 50 mM sucrose to a density of $4x10^8$cells/ml. About 250 μl cell suspension ($1x10^8$cells) was placed in a disposable electroporation cuvette of 4 mm gap. To the cell suspension, 5 μg of linearized plasmid DNA and 200 μg of carrier DNA (sheared salmon sperm DNA) were added. The electroporation cuvette was then incubated in an ice water bath at 16 °C for 10 min. An electrical pulse (1100 V/cm) was then applied to the cuvette at a capacitance of 25 μF (no shunt resistor was used for the electroporation) using a Gene Pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) electroporation apparatus. The cuvette

was then incubated at room temperature for 5 minutes, following which the cell suspension was transferred to 50 ml of modified Proteose media, and shaken on a gyratory shaker for 2 days. Following recovery, the cells were harvested at low speed (4000 rpm), resuspended in modified Proteose media, and plated out at low density on modified Proteose plates with 1% sucrose. After 7-10 days of incubation at 25°C in the dark, colonies representing transformed cells were visible on the plates.

[0493] Screening Transformants and Genotyping: The colonies were picked from dark grown-modified Proteose plates with 1% sucrose, and approximately the same amount of cells were transferred to 24 well-plates containing 1 ml of modified Proteose liquid media with 1% sucrose. The cultures were kept in dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm for 5 days.

[0494] To verify the presence of the invertase gene introduced in Chlorella transformants, DNA of each transformant was isolated and amplified with a set of gene-specific primers (CMV construct: forward primer (CAACCACGTCTTCAAAGCAA) (SEQ ID NO:6)/ reverse primer (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO:9), CV constructs: forward primer (TTGTCGGAATGTCATATCAA) (SEQ ID NO:10)/ reverse primer (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO:11), and HUP1 construct: forward primer (AACGCCTTTGTACAACTGCA) (SEQ ID NO:12)/ reverse primer (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO:13)). For quick DNA isolation, a volume of cells (approximately 5-10 uL in size) were resuspended in 50 uL of 10 mM Na-EDTA. The cell suspension was incubated at 100°C for 10 min and sonicated for 10 sec. After centrifugation at 12000g for 1 min, 3 uL of supernatant was used for the PCR reaction. PCR amplification was performed in the DNA thermal cycler (Perkin-Elmer GeneAmp 9600). The reaction mixture (50 uL) contained 3 uL extracted DNA, 100 pmol each of the respective primers described above, 200 uM dNTP, 0.5 units of Taq DNA polymerase (NEB), and Taq DNA polymerase buffer according to the manufacturer's instructions. Denaturation of DNA was carried out at 95°C for 5 min for the first cycle, and then for 30 sec. Primer annealing and extension reactions were carried out at 58°C for 30 sec and 72°C for 1 min respectively. The PCR products were then visualized on 1 % agarose gels stained with ethidium bromide. Figure 26 shows the PCR genotype results of *C. protothecoides* transformants using the gene-specific primers identified above. Arrows show the expected size of the PCR product, and stars represent DNA samples from each transformant showing the PCR product matched to the expected size (V: Vector only, WT: wild-type).

[0495] Growth in Liquid Culture: After five days growth in darkness, the genotype-positive transformants showed growth on minimal liquid Proteose media + 1% sucrose in darkness, while wild-type cells showed no growth in the same media in darkness.

EXAMPLE 23

Transformation of algal strains with a secreted invertase derived from *S. cerevisiae*

[0496] Secreted Invertase: A gene encoding a secreted sucrose invertase (Gen Bank Accession no. NP_012104 from *Saccharomyces cerevisiae*) was synthesized de-novo as a 1599 bp Asc I-Xho fragment that was subsequently sub-cloned into a pUC19 derivative possessing the Cauliflower Mosaic Virus 35s promoter and 3' UTR as EcoR I/Asc I and Xho/Sac I cassettes, respectively.

[0497] Growth of Algal Cells: Media used in these experiments was liquid base media (see Example 1) and solid base media (+ 1.5% agarose) containing fixed carbon in the form of sucrose or glucose (as designated) at 1% final concentration. The strains used in this experiment did not grow in the dark on base media in the absence of an additional fixed carbon source. Species were struck out on plates, and grown in the dark at 28°C. Single colonies were picked and used to inoculate 500 mL of liquid base media containing 1 % glucose and allowed to grow in the dark until mid-log phase, measuring cell counts each day. Each of the following strains had been previously tested for growth on sucrose in the dark as a sole carbon source and exhibited no growth, and were thus chosen for transformation with a secreted invertase: (1) *Chlorella protothecoides* (UTEX 31); (2) *Chlorella minutissima* (UTEX 2341); and (3) *Chlorella emersonii* (CCAP 211/15).

[0498] Transformation of Algal Cells via Particle Bombardment: Sufficient culture was centrifuged to give approximately 1-5 x 10^8 total cells. The resulting pellet was washed with base media with no added fixed carbon source. Cells were centrifuged again and the pellet was resuspended in a volume of base media sufficient to give 5 x 10^7 to 2 x 10^8 cells/ml. 250-1000 µl of cells were then plated on solid base media supplemented with 1% sucrose and allowed to dry onto the plate in a sterile hood. Plasmid DNA was precipitated onto gold particles according to the manufacturer's recommendations (Seashell Technology, La Jolla, CA). Transformations were carried out using a BioRad PDS He-1000 particle delivery system using 1350 psi rupture disks with the macrocarrier assembly set at 9cm from the rupture disk holder. Following transformations, plates were incubated in the dark at 28°C.

All strains generated multiple transformant colonies. Control plates transformed with no invertase insert, but otherwise prepared in an identical fashion, contained no colonies.

[0499] Analysis of *Chlorella protothecoides* transformants: Genomic DNA was extracted from *Chlorella protothecoides* wild type cells and transformant colonies as follows: Cells were resuspended in 100 ul extraction buffer (87.5 mM Tris Cl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% SDS) and incubated at 60°C, with occasional mixing via inversion, for 30 minutes. For PCR, samples were diluted 1:100 in 20 mM Tris Cl, pH 8.0.

[0500] Genotyping was done on genomic DNA extracted from WT, the transformants and plasmid DNA. The samples were genotyped for the marker gene. Primers 2383 (5' CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGC 3') (SEQ ID NO:20) and 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG 3') (SEQ ID NO:21) were used in this genotyping PCR. The PCR profile used was as follows: 94°C denaturation for 5 min; 35 cycles of 94°C -30 sec, 60°C - 30 sec, 72°C -3 min; 72°C -5 min. A band of identical size was amplified from the positive controls (plasmid) and two transformants of *Chlorella protothecoides* (UTEX 31), as shown in Figure 27.

[0501] Analysis of *Chlorella minutissima* and *Chlorella emersonii* transformants: Genomic DNA was extracted from *Chlorella* WT and the tranformants as follows: Cells were resuspended in 100 ul extraction buffer (87.5 mM Tris Cl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% SDS) and incubated at 60°C, with occasional mixing via inversion, for 30 minutes. For PCR, samples were diluted 1:100 in 20 mM Tris Cl, pH 8.0. Genotyping was done on genomic DNA extracted from WT, the transformants and plasmid DNA. The samples were genotyped for the marker gene. Primers 2336 (5' GTGGCCATATGGACTTACAA 3') (SEQ ID NO:22) and 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG 3') (SEQ ID NO:21) were designated primer set 2 (1215 bp expected product), while primers 2465 (5' CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG 3') (SEQ ID NO:23) and 2470 (5' CACCCGTCGTCATGTTCACGGAGCCCAGTGCG 3') (SEQ ID NO:24) were designated primer set 4 (1442 bp expected product). The PCR profile used was as follows: 94°C denaturation for 2 min; 29 cycles of 94°C -30 sec, 60°C - 30 sec, 72°C - 1 min, 30 sec; 72°C -5 min. A plasmid control containing the secreted invertase was used as a PCR control. Figure 28 shows the transformation of the *Chlorella minutissima* (UTEX 2341)

and *Chlorella emersonii* (CCAP 211/15) species of microalgae with the gene encoding a secreted invertase.

[0502] The sequence of the invertase construct corresponds to SEQ ID NO:25.

EXAMPLE 24

Growth of Algal Strains compared to *S. cerevisiae* on a Cellulosic Feedstock prepared with Celluclast

[0503] Strains and Culture Conditions: Algal strains used in this study are listed in Table 14 below, and were grown in Proteose media with exogenously provided cellulosic material and in some cases additional fixed carbon in the form of glucose. Twenty four algal strains were used in this study, including five different genera encompassing eleven different species of *Chlorella*, two of *Parachlorella* and *Prototheca*, and one each of *Bracteococcus* and *Pseudochlorella*. *Saccharomyces cerevisiae* (strain PJ-69-4A) was grown in YPD media (per liter, 10g Bacto-yeast extract, 20g Bacto peptone and 20g glucose). Both algae and yeast were grown at 28°C in the dark. Growth of these strains on Proteose media in the dark in the absence of cellulosic material or other additional fixed carbon either did not occur or was extremely minimal.

[0504] Liberation of Glucose from Cellulosic Material via Enzymatic Depolymerization Treatment: Wet, exploded corn stover material was prepared by the National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) by cooking corn stover in a 1.4% sulfuric acid solution and dewatering the resultant slurry. Using a Mettler Toledo Moisture analyzer, the dry solids in the wet corn stover were determined to be 24%. A 100 g wet sample was resuspended in deionized water to a final volume of 420 ml and the pH was adjusted to 4.8 using 10 N NaOH. Celluclast™ (Novozymes) (a cellulase) was added to a final concentration of 4% and the resultant slurry incubated with shaking at 50°C for 72 hours. The pH of this material was then adjusted to 7.5 with NaOH (negligible volume change), filter sterilized through a 0.22um filter and stored at -20°C. A sample was reserved for determination of glucose concentration using a hexokinase based kit from Sigma, as described below.

[0505] Determination of Glucose Concentration Liberated by Celluclast Treatment of Wet Corn Stover: Glucose concentrations were determined using Sigma Glucose Assay Reagent #G3293. Samples, treated as outlined above, were diluted 400 fold and 40µl was added to the

reaction. The corn stover cellulosic preparation was determined to contain approximately 23 g/L glucose.

[0506] Table 14. Algal strains grown on cellulosic feedstock.

Genus/Species	Source/Designation
Bracteococcus 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 moriformis	UTEX 1441
Prototheca moriformis	UTEX 1434
Pseudochlorella aquatica	SAG 2149

[0507] In Table 14, and as used herein, UTEX refers to the culture collection of algae at the University of Texas (Austin, Texas, USA), SAG refers to the Culture Collection of Algae at the University of Göttingen (Göttingen, Germany), CCAP refers to the culture collection of algae and protozoa managed by the Scottish Association for Marine Science (Scotland, United Kingdom) and CCALA refers to the culture collection of algal laboratory at the Institute of Botany (Třeboň, Czech Republic).

[0508] Determination of Growth on Cellulosic Material: After enzymatic treatment and saccharification of cellulose to glucose, xylose, and other monosaccharide sugars, the material prepared above was evaluated as a feedstock for the growth of 24 algal strains or *S. cerevisiae* in Proteose media or YPD media respectively. Proteose media was made up to a final glucose concentration of 23 g/L (the final concentration of glucose generated via

cellulolytic treatment of corn stover), as was YPD for growth of *S. cerevisiae*, by adding varying amounts of pure glucose and/or depolymerized cellulosic material. Varying concentrations of cellulosic material were included, providing 0, 12.5, 25, 50 and 100% of the 23 g/L glucose in each media, the components of which are shown in Table 15 below. One ml of the appropriate media was added to wells of a 24 well plate. *S. cerevisiae* grown heterotrophically at 28°C in YPD served as inoculum (20 ul) for the yeast wells. Twenty microliters of inoculum for the 24 algal strains was furnished by alga cells grown mixotrophically in Proteose media containing 20 g/L glucose.

[0509] Table 15. Cellulosic feedstock preparations.

Vol. of YPD 23.1 g/L Glucose (ml)	Vol. of Proteose Media 23.1 g/L Glucose (ml)	Vol. of 100% Cellulosics Made up to Proteose Media (ml)	Vol. of 100% Cellulosics Made up to YPD (ml)	Final Volume (ml)	Percent Cellulosics
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

[0510] Table 15 shows the volumes of depolymerized corn stover modified to contain Proteose or YPD media components that were added to Proteose or YPD media respectively to yield medias containing the indicated percentage of cellulosics. Medias were prepared in order to obtain a final glucose concentration of 23 g/L in all cases. Volume of media prior to the addition of either 20 µl of mid-log phase grown yeast or alga cells was 1 ml. Cells were incubated two days in the dark on the varying concentrations of cellulosic feedstocks at 28°C with shaking (300 rpm). Growth was assessed by measurement of absorbance at 750nm in a UV spectrophotometer. Surprisingly, all strains grew on the cellulosic material prepared with Celluclast, including media conditions in which 100% of fermentable sugar was cellulosic-derived.

EXAMPLE 25

Growth of 24 Algal Strains and *S. cerevisiae* on various Cellulosic Feedstocks prepared with Accellerase 1000™ and Celluclast™

[0511] Strains and Culture Conditions: Algal strains used in this Example are listed in Table 14 (above) and were grown in Proteose media plus additional fixed carbon in the form of depolymerized cellulosic material and/or pure glucose. *Saccharomyces cerevisiae* (strain pJ69-4a) was grown in YPD media plus additional fixed carbon in the form of depolymerized cellulosic material and/or pure glucose. Both algae and yeast were grown at 28°C in the dark.

[0512] Liberation of Glucose from Cellulosic Material via Enzymatic Depolymerization Treatment: Wet, exploded corn stover material was prepared by the National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) by cooking corn stover in a 1.4% sulfuric acid solution and dewatering the resultant slurry. Switchgrass was also prepared by The National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) utilizing the same method as for corn stover. Sugar beet pulp, generated via pectinase treatment, was supplied by Atlantic Biomass, Inc. of Frederick, MD. Using a Mettler Toledo Moisture analyzer, the dry solids were 24% in the wet corn stover, 26% in switch grass and 3.5% in sugar beet pulp. A 100 g wet sample of corn stover or switchgrass was resuspended in deionized water to a final volume of 420 ml and the pH adjusted to 4.8 using 10 N NaOH. For beet pulp, 8.8 grams dry solids were brought to 350 ml with deionized water and pH adjusted to 4.8 with 10N NaOH. For all feed stocks, Accellerase 1000™ (Genencor) (a cellulase enzyme complex) was used at a ratio of 0.25 ml enzyme per gram dry biomass. Samples were incubated with agitation (110 rpm) at 50°C for 72 hours. The pH of this material was then adjusted to 7.5 with NaOH (negligible volume change), filter sterilized through a 0.22um filter and used in growth experiments outlined below. A sample was reserved for determination of glucose concentration using a hexokinase-based kit from Sigma, as described below. The same set of cellulosic feedstocks were also prepared using Celluclast™ (Novozymes) (a cellulase) as described in the previous example.

[0513] Determination of Glucose Concentrations in Various Cellulosic Feedstocks Treated with Accellerase 1000: Glucose concentrations were determined using Sigma Glucose Assay Reagent #G3293. Samples, treated as outlined above, were diluted 400 fold and 40ul was added to the reaction. The cellulosic preparations from corn stover, switch grass and beet pulp were determined to contain approximately 23.6, 17.1 and 13.7 g/L glucose, respectively.

[0514] Determination of Growth on Cellulosic Material: After enzymatic depolymerization of cellulosic sources to glucose, xylose, and other monosaccharides, the materials prepared above were evaluated as feedstocks for the growth of the 24 algal strains listed in the Table

14 and *S. cerevisiae* in Proteose or YPD medias respectively. The medias were designed to contain a consistent concentration of glucose while varying the amount of cellulosic material derived from corn stover, switchgrass or beet pulp. A first set of Proteose and YPD media contained 23.6 g/L pure glucose, while a second set of media contained depolymerized corn stover, switchgrass and beet pulp, each of which contained 23.6 g/L glucose. The switchgrass and beet pulp medias were supplemented with 6.5 and 9.9 g/L pure glucose to normalize glucose in all cellulosic medias at 23.6 g/L. One ml of the appropriate media was added to wells of a 24 well plate. *S. cerevisiae* grown heterotrophically at 28°C in YPD served as inoculum (20 ul) for the yeast wells. Twenty microliters of inoculum for the 24 algal strains was furnished by alga cells grown mixotrophically in Proteose media containing 20 g/L glucose. all cells were incubated two days in the dark on the varying concentrations of cellulosic feedstocks at 28°C with shaking (300 rpm). Growth was assessed by measurement of absorbance at 750nm in a UV spectrophotometer. Surprisingly, all algae strains grew on the corn stover, switchgrass and beet pulp material prepared with Accellerase 1000™ or Celluclast™, including media conditions in which 100% of fermentable sugar was cellulosic-derived. Under no combination of cellulosic feedstock and depolymerization enzyme did *S. cerevisiae* outperform growth on an equivalent amount of pure glucose, indicating that inhibitors to yeast growth in the cellulosic material made a major impact on the productivity of the fermentation. Combinations of algae strains, depolymerization enzymes and feedstocks with 100% cellulosic-derived monosaccharides that outperformed 100% pure glucose are shown in Table 16.

[0515] Table 16. Combinations of algae, enzymes, and feedstocks.

Feedstock and Depolymerization Enzyme	**Genus/Species**	**Source/Designation**
corn stover/celluclast™	*Bracteococcus minor*	UTEX 66
beet pulp/accellerase™	*Chlorella ellipsoidea*	SAG 2141
switchgrass/accellerase™	*Chlorella kessleri*	UTEX 252
beet pulp/accellerase™	*Chlorella kessleri*	UTEX 397
switchgrass/accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2133
beet pulp/accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2133
switchgrass/accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
beet pulp/accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
corn stover/accellerase™	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
beet pulp/accellerase™	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
beet pulp/accellerase™	*Chlorella sp.*	SAG 241.80
beet pulp/accellerase™	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
switchgrass/accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441

beet pulp/accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
corn stover/accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
corn stover/celluclast™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
corn stover/accellerase™	*Prototheca moriformis*	UTEX 1434
beet pulp/accellerase™	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149

EXAMPLE 26

Carbon Utilization Screens

[0516] Strains and Culture Conditions: Seed cultures of the various strains of microalgae identified below were started as 1 ml liquid cultures in 24 well plates and were grown autotrophically for 48 hours in light, agitating at ~350 rpm. Plates were setup with 1.5% agarose-based solid Proteose media containing 1% of glucose, glycerol, xylose, sucrose, fructose, arabinose, mannose, galactose, or acetate as the sole fixed carbon source. For each strain, 5µl of culture from the autotrophic 24 well plate was spotted onto the solid media. Plates were incubated for 7 days in the dark at 28°C and examined for growth compared to a control plate containing no additional fixed carbon. Growth was observed for each of the species tested with each respective feedstock, as shown in Table 17 below. Growth of these strains on Proteose media in the dark in the absence of additional fixed carbon either did not occur or was extremely minimal.

[0517] Table 17. Algal species grown on various fixed-carbon feedstocks.

Fixed Carbon Source	Genus/Species	Source/Designation
Glucose	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Glucose	*Chlorella kessleri*	UTEX 397
Glucose	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 2805
Glucose	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Glucose	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149
Glucose	*Chlorella reisiglii*	CCAP 11/8
Glucose	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Glucose	*Prototheca stagnora*	UTEX 1442
Glucose	*Prototheca moriformis*	UTEX 1434
Glucose	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Glucose	*Scenedesmus rubescens*	CCAP 232/1
Glycerol	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Glycerol	*Chlorella protothecoides*	CCAP 211/8d
Glycerol	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Glycerol	*Prototheca moriformis*	UTEX 288
Glycerol	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Glycerol	*Chlorella minutissima*	UTEX 2341
Glycerol	*Chlorella sp.*	CCAP 211/61
Glycerol	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1663

Xylose	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2133
Xylose	*Chlorella ellipsoidea*	SAG 2141
Xylose	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149
Xylose	*Chlorella sp.*	CCAP 211/75
Xylose	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Xylose	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Sucrose	*Chlorella saccharophila*	UTEX 2469
Sucrose	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Sucrose	*Chlorella sp.*	UTEX EE102
Sucrose	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2198
Sucrose	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Sucrose	*Chlorella minutissima*	CCALA 20024
Fructose	*Chlorella kessleri*	UTEX 398
Fructose	*Chlorella trebouxiodes*	SAG 3.95
Fructose	*Parachlorella kessleri*	SAG 27.87
Fructose	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2214
Fructose	*Chlorella protothecoides*	UTEX 31
Fructose	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Fructose	*Chlorella reisiglii*	CCAP 11/8
Fructose	*Chlorella protothecoides*	CCAP 211/8d
Fructose	*Prototheca moriformis*	UTEX 1435
Fructose	*Scenedesmus rubescens*	CCAP 232/1
Arabinose	*Chlorella sp.*	CCAP 211/75
Mannose	*Chlorella kessleri*	UTEX 263
Mannose	*Chlorella saccharophila*	UTEX 2911
Mannose	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Mannose	*Chlorella sp.*	SAG 241.80
Mannose	*Chlorella angustoellipsoidea*	SAG 265
Mannose	*Chlorella ellipsoidea*	SAG 2141
Mannose	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Mannose	*Chlorella emersonii*	CCAP 211/15
Mannose	*Bracteococcus minor*	UTEX 66
Mannose	*Prototheca stagnora*	UTEX 1442
Mannose	*Prototheca moriformis*	UTEX 1439
Mannose	*Chlorella cf. minutissima*	CCALA 20024
Mannose	*Scenedesmus rubescens*	CCAP 232/1
Galactose	*Bracteococcus minor*	UTEX 66
Galactose	*Parachlorella kessleri*	SAG 14.82
Galactose	*Parachlorella beijerinckii*	SAG 2046
Galactose	*Chlorella protothecoides*	UTEX 25
Galactose	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1602
Galactose	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Galactose	*Pseudochlorella aquatica*	SAG 2149
Galactose	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2214
Galactose	*Chlorella ellipsoidea*	CCAP 211/42
Galactose	*Chlorella ellipsoidea*	CCAP 211/50
Galactose	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Galactose	*Chlorella protothecoides*	UTEX 264

Galactose	*Bracteococcus medionucleatus*	UTEX 1244
Galactose	*Prototheca moriformis*	UTEX 1439
Galactose	*Prototheca moriformis*	UTEX 1441
Galactose	*Chlorella kessleri*	CCALA 252
Acetate	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1230
Acetate	*Chlorella sorokiniana*	UTEX 1810
Acetate	*Chlorella luteoviridis*	UTEX 22
Acetate	*Parachlorella kessleri*	SAG 12.80
Acetate	*Parachlorella kessleri*	SAG 27.87
Acetate	*Chlorella sp.*	SAG 241.80
Acetate	*Chlorella luteoviridis*	SAG 2214
Acetate	*Chlorella protothecoides*	UTEX 31
Acetate	*Chlorella protothecoides*	UTEX 411
Acetate	*Chlorella ellipsoidea*	CCAP 211/42
Acetate	*Chlorella ovalis*	CCAP 211/21A
Acetate	*Chlorella protothecoides*	CCAP 211/8d
Acetate	*Prototheca stagnora*	UTEX 1442
Acetate	*Chlorella protothecoides*	UTEX 250
Acetate	*Chlorella sorokiniana*	CCALA 260
Acetate	*Chlorella vulgaris*	CCAP 211/79
Acetate	*Parachlorella kessleri*	SAG 14.82

EXAMPLE 27

Production of Renewable Diesel

[0518] Cell Production: An F-Tank batch of *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) (about 1,200 gallons) was used to generate biomass for extraction processes. The batch (#ZA07126) was allowed to run for 100 hours, while controlling the glucose levels at 16 g/L, after which time the corn syrup feed was terminated. Residual glucose levels dropped to <0 g/L two hours later. This resulted in a final age of 102 hours. The final broth volume was 1,120 gallons. Both in-process contamination checks and a thorough analysis of a final broth sample failed to show any signs of contamination. The fermentation broth was centrifuged and drum dried. Drum dried cells were resuspended in hexane and homogenized at approximately 1000 bar. Hexane extraction was then performed using standard methods, and the resulting algal triglyceride oil was determined to be free of residual hexane.

[0519] Production of Renewable Diesel: The algal triglyceride oil had a lipid profile of approximately 3% C18:0, 71% C18:1, 15% C18:2, 1% C18:3, 8% C16:0, and 2% other components. The oil was first subjected to hydrocracking, resulting in an approximate 20% yield loss to water and gases. Hydroisomerization was then performed, with an approximate 10% loss in yield to gases. A first distillation was then performed to remove the naptha

fraction, leaving the desired product. Approximately 20% of the material was lost to naptha in this first distillation. A second distillation was then performed at a temperature sufficient to remove fractions necessary to meet the ASTM D975 specification but leave a bottom fraction that did not meet the 90% point for a D975 distillation. Approximately 30% of the material was left in the bottom fraction in the second distillation. The resulting material was then tested for all ASTM D975 specifications.

[0520] Figures 29 and 30 illustrate a gas chromatograph and a boiling point distribution plot, respectively, of the final renewable diesel product produced by the method of the invention. Table 18 shows the boiling point distribution of the resulting renewable diesel product, and Table 19 shows the results of an analysis of the final product for compliance with the ASTM D975 specifications.

[0521] Table 18. Boiling point distribution of renewable diesel product.

Recovered mass%	BP °C	Recovered mass%	BP °C	Recovered mass%	BP °C	Recovered mass%	BP °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		

[0522] Table 19. Analytical report for renewable diesel product using D975 specifications.

Method Number	Test Description	Results	Units
D93A	Flash Point (PMCC)	70	°C
D2709	Water and Sediment	0	Vol %
D86	Distillation 90% (Recovered)	301.0 / 573.9	°C / °F
D445	Kinematic Viscosity @ 40.0°C (104.0°F)	2.868	mm2/sec
D482	Ash	< 0.001	Wt %
D5453	Sulfur	2.4	ppm
D130	Copper Corrosion 3hours @ 50°C	1b	
D613	Cetane Number ***	>65	
D976	Calculated Cetane Index	71.2	
D2500	Cloud Point	-3	°C
D524	Ramsbottom 10% Carbon Residue	0.02	Wt %
D97	Pour Point	-3	°C
D2274	Total Insolubles (Oxidation Stability) 40Hour Test ***	4.0	mg/100mL
D4052	Density @ 15.0°C (59.0°F)	793.8	kg/m³
D4176-1	Appearance by Visual Inspection (Lab)	Clear and Bright- Pass	Visual
D4176-1	Appearance by Visual Inspection (Lab)	Free Water- Pass	Visual
D4176-1	Appearance by Visual Inspection (Lab)	Particulates- Pass	Visual
D1500	ASTM Color	L 0.5	
D664	Acid Number	< 0.10	mg KOH/g
D6079	Lubricity (Wear Scar)	405	µm

SEQUENCES

SEQ ID NO:1

HUP promoter from Chlorella (subsequence of GenBank accession number X55349):

gatcagacgggcctgacctgcgagataatcaagtgctcgtaggcaaccaactcagcagctgcttggtgttgggtctgcaggatagtgtt
gcagggccccaaggacagcaggggaacttacaccttgtccccgacccagttttatggagtgcattgcctcaagagcctagccggagc
gctaggctacatacttgccgcaccggtatgaggggatatagtactcgcactgcgctgtctagtgagatgggcagtgctgcccataaac
aactggctgctcagccatttgttggcggaccattctgggggggccagcaatgcctgactttcgggtagggtgaaaactgaacaaagac
taccaaaacagaatttcttcctccttggaggtaagcgcaggccggcccgcctgcgcccacatggcgctccgaacacctccatagctgt
aagggcgcaaacatggccggactgttgtcagcactctttcatggccatacaaggtcatgtcgagattagtgctgagtaagacactatca
ccccatgttcgattgaagccgtgacttcatgccaacctgcccctgggcgtagcagacgtatgccatcatgaccactagccgacatgcg
ctgtcttttgccaccaaaacaactggtacaccgctcgaagtcgtgccgcacacctccgggagtgagtccggcgactcctccccggcg
ggccgcggccctacctgggtagggtcgccatacgcccacgaccaaacgacgcaggaggggattggggtagggaatcccaaccag
cctaaccaagacggcacctataataataggtgggggactaacagccctatatcgcaagctttgggtgcctatcttgagaagcacgag
ttggagtggctgtgtacggtcgaccctaaggtgggtgtgccgcagcctgaaacaaagcgtctagcagctgcttctataatgtgtcagcc
gttgtgtttcagttatattgtatgctattgtttgttcgtgctagggtggcgcaggcccacctactgtggcgggccattggttggtgcttgaatt
gcctcaccatctaaggtctgaacgctcactcaaacgcctttgtacaactgcagaactttccttggcgctgcaactacagtgtgcaaacca
gcacatagcactcccttacatcacccagcagtacaaca

SEQ ID NO:2

Chlorella ellipsoidea nitrate reductase promoter from AY307383:

cgctgcgcaccagggccgccagctcgctgatgtcgctccaaatgcggtcccccgatttttttgttcttcatcttctccaccttggtggccttc
ttggccagggccttcagctgcatgcgcacagaccgttgagctcctgatcagcatcctcaggaggccctttgacaagcaagcccctgtg
caagcccattcacggggtaccagtggtgctgaggtagatgggtttgaaaaggattgctcggtcgattgctgctcatggaattggcatgt
gcatgcatgttcacaatatgccaccaggctttggagcaagagagcatgaatgccttcaggcaggttgaaagttcctgggggtgaagag
gcagggccgaggattggaggaggaaagcatcaagtcgtcgctcatgctcatgttttcagtcagagtttgccaagctcacaggagcag
agacaagactggctgctcaggtgttgcatcgtgtgtgtggtgggggggggggggttaatacggtacgaaatgcacttggaattcccac
ctcatgccagcggacccacatgcttgaattcgaggcctgtggggtgagaaatgctcactctgccctcgttgctgaggtacttcaggccg
ctgagctcaaagtcgatgccctgctcgtctatcagggcctgcacctctgggctgaccggctcagcctccttcgcgggcatggagtagg
cgccggcagcgttcatgtccgggcccagggcagcggtggtgccataaatgtcggtgatggtggggaggggggccgtcgccacacc
attgccgttgctggctgacgcatgcacatgtggcctggctggcaccggcagcactggtctccagccagccagcaagtggctgttcag
gaaagcggccatgttgttggtccctgcgcatgtaattccccagatcaaaggagggaacagcttggatttgatgtagtgcccaaccgga
ctgaatgtgcgatggcaggtccctttgagtctcccgaattactagcagggcactgtgacctaacgcagcatgccaaccgcaaaaaaat
gattgacagaaaatgaagcggtgtgtcaatatttgctgtatttattcgttttaatcagcaaccaagttcgaaacgcaactatcgtggtgatca
agtgaacctcatcagacttacctcgttcggcaaggaaacggaggcaccaaattccaatttgatattatcgcttgccaagctagagctgat

ctttgggaaaccaactgccagacagtggactgtgatggagtgccccgagtggtggagcctcttcgattcggttagtcattactaacgtg
aaccctcagtgaagggaccatcagaccagaaagaccagatctcctcctcgacaccgagagagtgttgcggcagtaggacgacaag

SEQ ID NO:3

B. braunii malate dehydrogenase 5'UTR:

aattggaaaccccgcgcaagaccgggttgtttggccgcctgaccggaaaggggggggcctgtcccgaaggggtctatctcttgggg
gatgtcgggcgcggaaagtcgatgttgatggacctcttcttcgaccatgtcggggtcgaggccaagagccgcgtccatttcgccgagt
tcatgatggaggtgaatgaccgcatcgccaccgaacgcgccaagaagcgggcgaccgatcgccccccgtcgctgcagcccttgccg
aggaagtccggctgctggcgttcgacgagatgatggtgacgaacagcccggacgcgatgatcctgtcgcggctgttcaccgcgctg
atcgaggcgggggtgacgatcgtcaccacctccaaccggccgcccagggatctctataagaacgggctcaaccgcgagcatttcct
gcccttcatcgcgctgatcgaggcgcggctggacgtgctggcgctgaacggcccgaccgactatcggcgcgaccggctggggcg
gctggacacgtggttggtgcccaatggccccaaggcgacgattaccttgtcggcggcgttcttccgcctgaccgactatccggtcgag
gatgccgcgcatgtgccctctgaggacctgaaggtgggcgggcgcgtgctgaatgtccccaaggcgctgaagggcgtcgcggtctt
ctcgttcaagcggttgtgcggcgaagcgcgggggggcggcggactatctggcggtcgcgcggggcttccacaccgtcatcctggtcg
gaatccccaagctgggggcggagaaccgcaacgaggcggggcgcttcgtccagctgatcgacgcgctctacgaacataaggtcaa
gctgctcgccgcagccgatgccagcccgccgaactctatgaaaccggcgacggccggttcgagtttgagcgcagatcagccggttg
gaagagatgcgctccgaggattatctggcccaaggccatggctcggaggggccttgatcaggccttaatgcacttcgcaaccattatc
gtttaaaatcttaaactctgtggaataacggttccccgacgccgcaatacacgtacgtccactacggagtaggattgga

SEQ ID NO:4

Chlamydomonas RBCS2 promoter:

cgcttagaagatttcgataaggcgccagaaggagcgcagccaaaccaggatgatgtttgatggggtatttgagcacttgcaacccttat
ccggaagccccctggcccacaaaggctaggcgccaatgcaagcagttcgcatgcagcccctggagcggtgccctcctgataaacc
ggccaggggggcctatgttctttacttttttacaagagaagtcactcaacatcttaaacggtcttaagaagtctatccgg

SEQ ID NO:5

CMV-Hyg-CMV BamHI-SacII cassette from pCAMBIA:

ggatccccgggaattcggcgcgccgggcccaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctca
gaagaccaaagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatca
aaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgaca
gtggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgat
gtgataacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgagacttttc
aacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaaggtgg
cacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccaccc
acgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatg

acgcacaatcccactatccttcgcaagaccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctgaaatcaccagtctctct
ctacaaatctatctctctcgagctttcgcagatcccgggggcaatgagatatgaaaaagcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaa
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

MANKLLLLLLLLLPLAASG

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
agacccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctgaaatcaccagtctctctctacaaatctatctctggcgcgcc
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

09-149183 (Part 2)
160

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of producing renewable diesel, comprising:

(a) culturing a population of microorganisms in the presence of a fixed carbon source, wherein:

(i) the microorganisms accumulate at least 10% of their dry cell weight as lipid; and

(ii) the fixed carbon source is selected from the group consisting of glycerol, depolymerized cellulosic material, sucrose, molasses, glucose, arabinose, galactose, xylose, fructose, arabinose, mannose, acetate, and any combination of the foregoing;

(b) isolating lipid components from the cultured microorganisms; and

(c) subjecting the isolated lipid components to one or more chemical reactions to generate straight chain alkanes,

whereby renewable diesel is produced.

2. The method of claim 1, wherein the microorganism is a microalgae.

3. The method of claim 2, wherein the microorganism is selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

4. The method of claim 3, wherein the microorganism is a species of the genus *Chlorella*.

5. The method of claim 4, wherein the microorganism is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella, and *Chlorella zofingiensis.*

6. The method of claim 1, wherein the microorganism is an oleaginous yeast.

7. The method of claim 6, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

8. The method of claim 1, wherein the microorganism is a fungus.

9. The method of claim 8, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium.*

10. The method of claim 1, wherein the microorganism contains at least one exogenous sucrose utilization gene.

11. The method of claim 10, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

12. The method of claim 1, wherein the microorganism contains at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

13. The method of claim 12, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

14. A method of producing jet fuel, comprising:

(a) culturing a population of microorganisms in the presence of a fixed carbon source, wherein:

(i) the microorganisms accumulate at least 10% of their dry cell weight as lipid; and

(ii) the fixed carbon source is selected from the group consisting of glycerol, depolymerized cellulosic material, sucrose, glucose, arabinose, galactose, xylose, fructose, arabinose, mannose, acetate, and any combination of the foregoing;

(b) isolating lipid components from the cultured microorganisms; and

(c) subjecting the isolated lipid components to one or more chemical reactions to generate straight chain alkanes,

whereby jet fuel is produced.

15. The method of claim 14, wherein the microorganism is a microalgae.

16. The method of claim 15, wherein the microorganism is selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

17. The method of claim 16, wherein the microorganism is a species of the genus *Chlorella*.

18. The method of claim 17, wherein the microorganism is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella,* and *Chlorella zofingiensis*.

19. The method of claim 14, wherein the microorganism is an oleaginous yeast.

20. The method of claim 19, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

21. The method of claim 14, wherein the microorganism is a fungus.

22. The method of claim 21, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

23. The method of claim 14, wherein the microorganism contains at least one exogenous sucrose utilization gene.

24. The method of claim 23, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

25. The method of claim 14, wherein the microorganism contains at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

26. The method of claim 25, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

27. A composition of liquid hydrocarbons made according to the method of claim 1, wherein the composition conforms to the specifications of ASTM D975.

28. The composition of claim 27, wherein the microorganism is a microalgae.

29. The composition of claim 28, wherein the microorganism is selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

30. The composition of claim 29, wherein the microorganism is a species of the genus *Chlorella*.

31. The composition of claim 30, wherein the microorganism is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella,* and *Chlorella zofingiensis*.

32. The composition of claim 27, wherein the microorganism is an oleaginous yeast.

33. The composition of claim 32, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica*.

34. The composition of claim 27, wherein the microorganism is a fungus.

35. The composition of claim 34, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

36. The composition of claim 27, wherein the microorganism contains at least one exogenous sucrose utilization gene.

37. The composition of claim 36, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

38. The composition of claim 27, wherein the microorganism contains at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

39. The composition of claim 38, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

40. A composition of liquid hydrocarbons produced according to the method of claim 14, wherein the composition conforms to the specifications of ASTM D1655.

41. The composition of claim 40, wherein the microorganism is a microalgae.

42. The composition of claim 41, wherein the microorganism is selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

43. The composition of claim 42, wherein the microorganism is a species of the genus *Chlorella*.

44. The composition of claim 43, wherein the microorganism is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella, and *Chlorella zofingiensis.*

45. The composition of claim 40, wherein the microorganism is an oleaginous yeast.

46. The composition of claim 45, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

47. The composition of claim 40, wherein the microorganism is a fungus.

48. The composition of claim 47, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium.*

49. The composition of claim 40, wherein the microorganism contains at least one exogenous sucrose utilization gene.

50. The composition of claim 49, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

51. The composition of claim 40, wherein the microorganism contains at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

52. The composition of claim 51, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

53. A microalgae or yeast cell that has been genetically engineered and/or selected to express a lipid pathway enzyme at an altered level compared to a wild-type cell of the same species.

54. The cell of claim 53, wherein the cell produces more lipid compared to the wild-type cell when both cells are grown under the same conditions.

55. The cell of claim 53, wherein the cell has been genetically engineered and/or selected to express a lipid pathway enzyme at a higher level than the wild-type cell.

56. The cell of claim 55, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of pyruvate dehydrogenase, acetyl-CoA carboxylase, acyl carrier protein, and glycerol-3 phosphate acyltransferase.

57. The cell of claim 53, wherein the cell has been genetically engineered and/or selected to express a lipid pathway enzyme at a lower level than the wild-type cell.

58. The cell of claim 57, wherein the lipid pathway enzyme comprises citrate synthase.

59. The cell of claim 53, wherein the cell has been genetically engineered and/or selected to express a global regulator of fatty acid synthesis at an altered level compared to the wild-type cell, whereby the expression levels of a plurality of fatty acid synthetic genes are altered compared to the wild-type cell.

60. The cell of claim 53, wherein the lipid pathway enzyme comprises an enzyme that modifies a fatty acid.

61. The cell of claim 60, wherein the lipid pathway enzyme is selected from a stearoyl-ACP desaturase and a glycerolipid desaturase.

62. The cell of claim 53, wherein the cell is a microalgae species selected from Table 1.

63. The microalgae cell of claim 62, wherein the microalgae is of the genus *Chlorella*.

64. The microalgae cell of claim 63, wherein the microalgae is of the species selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella, and Chlorella zofingiensis.*

65. An oil-producing microbe containing one or more exogenous genes, wherein the exogenous genes encode protein(s) selected from the group consisting of a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA reductase, a fatty aldehyde reductase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, a fatty aldehyde decarbonylase, and an acyl carrier protein.

66. The microbe of claim 65, wherein the microbe is a microalgae.

67. The microbe of claim 65, wherein the microbe is an oleaginous yeast.

68. The microbe of claim 67, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

69. The microbe of claim 65, wherein the microbe is a fungus.

70. The microbe of claim 69, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus*

terreus, Pennicillium iilacinum, a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

71. The microbe of claim 65, wherein the microbe is selected from the group consisting of the microorganisms listed in Table 1.

72. The microbe of claim 71, wherein the microbe is a species of the genus *Chlorella*.

73. The microbe of claim 72, wherein the species is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella, and Chlorella zofingiensis*.

74. The microbe of claim 73, wherein the species is *Chlorella protothecoides, Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea,* or *Chlorella sp.*

75. The microbe of claim 65, wherein the exogenous gene is in operable linkage with a promoter, which is inducible or repressible in response to a stimulus.

76. The microbe of claim 75, wherein the stimulus is selected from the group consisting of an exogenously provided small molecule, heat, cold, and light.

77. The microbe of claim 65, wherein the exogenous gene is expressed in a cellular compartment.

78. The microbe of claim 77, wherein the cellular compartment is selected from the group consisting of a chloroplast and a mitochondrion.

79. The microbe of claim 65, wherein the exogenous gene encodes a fatty acid acyl-ACP thioesterase.

80. The microbe of claim 79, wherein the thioesterase encoded by the exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from an acyl carrier protein (ACP).

81. The microbe of claim 80, wherein the thioesterase encoded by the exogenous gene catalyzes the cleavage of a 10 to 14-carbon fatty acid from an ACP.

82. The microbe of claim 81, wherein the thioesterase encoded by the exogenous gene catalyzes the cleavage of a 12-carbon fatty acid from an ACP.

83. The microbe of claim 65, wherein the exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase.

84. The microbe of claim 83, wherein the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of a 20 to 30-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol.

85. The microbe of claim 83, wherein the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol.

86. The microbe of claim 85, wherein the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of a 10 to 14-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol.

87. The microbe of claim 86, wherein the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of a 12-carbon fatty acyl-CoA to dodecanol.

88. The microbe of claim 65, wherein the exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA reductase.

89. The microbe of claim 88, wherein the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding aldehyde.

90. The microbe of claim 89, wherein the reductase encoded by the exogenous gene catalyzes the reduction of a 12-carbon fatty acyl-CoA to dodecanal.

91. The microbe of claim 65, wherein the microbe further contains one or more exogenous sucrose utilization genes.

92. A microbe containing two exogenous genes, wherein a first exogenous gene encodes a fatty acyl-ACP thioesterase and a second exogenous gene encodes a protein selected from the group consisting of a fatty acyl-CoA reductase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, and an acyl carrier protein.

93. The microbe of claim 92, wherein the microbe is a microalgae.

94. The microbe of claim 92, wherein the microbe is an oleaginous yeast.

95. The microbe of claim 94, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

96. The microbe of claim 92, wherein the microbe is a fungus.

97. The microbe of claim 96, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium.*

98. The microbe of claim 92, wherein the microbe is selected from the group consisting of the microorganisms listed in Table 1.

99. The microbe of claim 98, wherein the microbe is a species of the genus *Chlorella*.

100. The microbe of claim 99, wherein the species is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella, and Chlorella zofingiensis*.

101. The microbe of claim 100, wherein the species is *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides*.

102. The microbe of claim 92, wherein the two exogenous genes are each in operable linkage with a promoter, which is inducible in response to a stimulus.

103. The microbe of claim 102, wherein each promoter is inducible in response to an identical stimulus.

104. The microbe of claim 92, wherein the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from an ACP.

105. The microbe of claim 104, wherein the second exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase which catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol.

106. The microbe of claim 105, wherein the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of a 10 to 14-carbon fatty acid from an ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of a 10 to 14-carbon fatty acyl-CoA to the corresponding primary alcohol, wherein the thioesterase and the reductase act on the same carbon chain length.

107. The microbe of claim 106, wherein the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of a 12-carbon fatty acid from an ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of a 12-carbon fatty acyl-CoA to dodecanol.

108. The microbe of claim 104, wherein the second exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA reductase which catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding aldehyde.

109. The microbe of claim 92, wherein the second exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA reductase, and the microbe further contains a third exogenous gene encoding a fatty aldehyde decarbonylase.

110. The microbe of claim 109, wherein the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from an ACP, the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding fatty aldehyde, and the decarbonylase encoded by the third exogenous gene catalyzes the conversion of an 8 to 18-carbon fatty aldehyde to a corresponding alkane, wherein the thioesterase, the reductase, and the decarbonylase act on the same carbon chain length.

111. The microbe of claim 92, wherein the microbe further contains one or more exogenous sucrose utilization genes.

112. The microbe of claim 92, wherein the second exogenous gene encodes an acyl carrier protein that is naturally co-expressed with the fatty acyl-ACP thioesterase.

113. The microbe of claim 92, wherein the second exogenous gene encodes an acyl carrier protein, and the microbe further contains a third exogenous gene encoding a

protein selected from the group consisting of a fatty acyl-CoA reductase and a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase.

114. The microbe of claim 113, wherein the third exogenous gene encodes a fatty acyl-CoA reductase, and the microbe further contains a fourth exogenous gene encoding a fatty aldehyde decarbonylase.

115. A method of producing a molecule in a microbe population, the method comprising culturing a population of microbes in a culture medium, wherein the microbes contain:

(i) a first exogenous gene encoding a fatty acyl-ACP thioesterase, and

(ii) a second exogenous gene encoding a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase; and

wherein the microbes synthesize a fatty acid linked to an acyl carrier protein (ACP), the fatty acyl-ACP thioesterase catalyzes the cleavage of the fatty acid from the ACP to yield, through further processing, a fatty acyl-CoA, and the fatty acyl-CoA/aldehyde reductase catalyzes the reduction of the acyl-CoA to an alcohol.

116. The method of claim 115, wherein the microbe is a microalgae.

117. The method of claim 115, wherein the microbe is an oleaginous yeast.

118. The method of claim 117, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

119. The method of claim 115, wherein the microbe is a fungus.

120. The method of claim 119, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium.*

121. The method of claim 115, wherein the microbe is selected from the group consisting of the microorganisms listed in Table 1.

122. The method of claim 121, wherein the microbe is a species of the genus *Chlorella*.

123. The method of claim 122, wherein the species is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella, and Chlorella zofingiensis*.

124. The method of claim 123, wherein the species is *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.* or *Chlorella protothecoides*.

125. The method of claim 115, wherein the culture medium contains glycerol.

126. The method of claim 125, wherein the glycerol is a byproduct of a transesterification process.

127. The method of claim 125, wherein the culture medium contains glycerol and at least one other fixed carbon source.

128. The method of claim 127, wherein the at least one other fixed carbon source is sucrose.

129. The method of claim 127, wherein all of the glycerol and all of the at least one other fixed carbon source are provided to the microbes at the beginning of fermentation.

130. The method of claim 127, wherein the glycerol and the at least one other fixed carbon source are fed to the microbes at a predetermined rate over the course of fermentation.

131. The method of claim 127, wherein:

(a) glycerol is provided to the microbes in the absence of the at least one other fixed carbon source for a first period of time;

(b) the at least one other fixed carbon source is provided at the end of the first period of time; and

(c) the microbes are cultured for a second period of time in the presence of the at least one other fixed carbon source.

132. The method of claim 115, wherein the exogenous genes are in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a first stimulus, and wherein the method further comprises:

providing the first stimulus; and

incubating the population of microbes for a first period of time in the presence of the first stimulus to produce an alcohol.

133. The method of claim 132, further comprising extracting the alcohol from aqueous biomass.

134. The method of claim 115, wherein the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from the ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol, wherein the thioesterase and the reductase act on the same carbon chain length.

135. The method of claim 134, wherein the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 10 to 14-carbon fatty acid from the ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 10 to 14-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding primary alcohol, wherein the thioesterase and the reductase act on the same carbon chain length.

136. The method of claim 135, wherein the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of a 12-carbon fatty acid from the ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of a 12-carbon fatty acyl-CoA to dodecanol.

137. The method of claim 115, wherein the microbes further contain a third exogenous gene encoding an acyl carrier protein.

138. The method of claim 137, wherein the third exogenous gene encodes an acyl carrier protein that is naturally co-expressed with the fatty acyl-ACP thioesterase.

139. A method of producing a lipid molecule in a microbe population, the method comprising culturing a population of microbes in a culture medium, wherein the microbes contain:

(i) a first exogenous gene encoding a fatty acyl-ACP thioesterase, and

(ii) a second exogenous gene encoding a fatty acyl-CoA reductase; and

wherein the microbes synthesize a fatty acid linked to an acyl carrier protein (ACP), the fatty acyl-ACP thioesterase catalyzes the cleavage of the fatty acid from the ACP to yield, through further processing, a fatty acyl-CoA, and the fatty acyl-CoA reductase catalyzes the reduction of the acyl-CoA to an aldehyde.

140. The method of claim 139, wherein the microbe is a microalgae.

141. The method of claim 139, wherein the microbe is an oleaginous yeast.

142. The method of claim 139, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica*.

143. The method of claim 139, wherein the microbe is a fungus.

144. The method of claim 143, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

145. The method of claim 139, wherein the microbe is selected from the group consisting of the microorganisms listed in Table 1.

146. The method of claim 145, wherein the microbe is a species of the genus *Chlorella*.

147. The method of claim 146, wherein the species is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella, and Chlorella zofingiensis*.

148. The method of claim 147, wherein the species is *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides*.

149. The method of claim 139, wherein the exogenous genes are in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a first stimulus, and wherein the method further comprises:

providing the first stimulus; and

incubating the population of microbes for a first period of time in the presence of the first stimulus to produce an aldehyde.

150. The method of claim 149, further comprising extracting the aldehyde from aqueous biomass.

151. The method of claim 139, wherein the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from the ACP, and the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding aldehyde, wherein the thioesterase and the reductase act on the same carbon chain length.

152. The method of claim 139, wherein the microbes further contain a third exogenous gene encoding a fatty aldehyde decarbonylase that catalyzes the conversion of the aldehyde to an alkane.

153. The method of claim 152, wherein the exogenous genes are in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a first stimulus, and wherein the method further comprises:

providing the first stimulus; and

incubating the population of microbes for a first period of time in the presence of the first stimulus to produce an alkane.

154. The method of claim 153, further comprising extracting the alkane from aqueous biomass.

155. The method of claim 152, wherein the thioesterase encoded by the first exogenous gene catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from the ACP, the reductase encoded by the second exogenous gene catalyzes the reduction of an 8 to 18-carbon fatty acyl-CoA to a corresponding aldehyde, and the decarbonylase encoded by the third exogenous gene catalyzes the conversion of an 8 to 18-carbon aldehyde to a corresponding alkane, wherein the thioesterase, the reductase, and the decarbonylase act on the same carbon chain length.

156. The method of claim 139, wherein the microbes further contain a third exogenous gene encoding an acyl carrier protein.

157. The method of claim 156, wherein the third exogenous gene encodes an acyl carrier protein that is naturally co-expressed with the fatty acyl-ACP thioesterase.

158. The method of claim 156, wherein the microbes further contain a fourth exogenous gene encoding a fatty aldehyde decarbonylase that catalyzes the conversion of the aldehyde to an alkane.

159. The method of claim 139, wherein the culture medium contains glycerol.

160. The method of claim 159, wherein the glycerol is a byproduct of a transesterification process.

161. The method of claim 159, wherein the culture medium contains glycerol and at least one other fixed carbon source.

162. The method of claim 161, wherein the at least one other fixed carbon source is sucrose.

163. The method of claim 161, wherein all of the glycerol and all of the at least one other fixed carbon source are provided to the microbes at the beginning of fermentation.

164. The method of claim 161, wherein the glycerol and the at least one other fixed carbon source are fed to the microbes at a predetermined rate over the course of fermentation.

165. The method of claim 161, wherein:

(a) glycerol is provided to the microbes in the absence of the at least one other fixed carbon source for a first period of time;

(b) the at least one other fixed carbon source is provided at the end of the first period of time; and

(c) the microbes are cultured for a second period of time in the presence of the at least one other fixed carbon source.

166. A method of producing a fatty acid molecule having a specified carbon chain length in a microbe population, the method comprising culturing a population of lipid-producing microbes in a culture medium, wherein the microbes contain an exogenous gene encoding a fatty acyl-ACP thioesterase having an activity specific to a carbon chain length, and wherein the microbes synthesize a fatty acid linked to an acyl carrier protein (ACP) and the thioesterase catalyzes the cleavage of the fatty acid from the ACP when the fatty acid has been synthesized to the specific carbon chain length.

167. The method of claim 166, wherein the microbe is a microalgae.

168. The method of claim 166, wherein the microbe is an oleaginous yeast.

169. The method of claim 168, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

170. The method of claim 166, wherein the microbe is a fungus.

171. The method of claim 170, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium.*

172. The method of claim 166, wherein the microbe is selected from the group consisting of the microorganisms listed in Table 1.

173. The method of claim 172, wherein the microbe is a species of the genus *Chlorella.*

174. The method of claim 173, wherein the species is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella, and Chlorella zofingiensis.

175. The method of claim 174, wherein the species is *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides.*

176. The method of claim 166, wherein the exogenous gene is in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a first stimulus, and wherein the method further comprises:

providing the first stimulus; and

incubating the population of microbes for a period of time in the presence of the first stimulus.

177. The method of claim 176, further comprising extracting the fatty acid from the aqueous biomass.

178. The method of claim 166, wherein the microbes further contain a second exogenous gene encoding an acyl carrier protein.

179. The method of claim 178, wherein the second exogenous gene encodes an acyl carrier protein that is naturally co-expressed with the fatty acyl-ACP thioesterase.

180. The method of claim 166, wherein the acyl-ACP thioesterase catalyzes the cleavage of an 8 to 18-carbon fatty acid from the ACP.

181. The method of claim 166, wherein the culture medium contains glycerol.

182. The method of claim 181, wherein the glycerol is a byproduct of a transesterification process.

183. The method of claim 181, wherein the culture medium contains glycerol and at least one other fixed carbon source.

184. The method of claim 183, wherein the at least one other carbon source is sucrose.

185. The method of claim 183, wherein all of the glycerol and all of the at least one other fixed carbon source are provided to the microbes at the beginning of fermentation.

186. The method of claim 183, wherein the glycerol and the at least one other fixed carbon source are fed to the microbes at a predetermined rate over the course of fermentation.

187. The method of claim 183, wherein:

(a) glycerol is provided to the microbes in the absence of the at least one other fixed carbon source for a first period of time;

(b) the at least one other fixed carbon source is provided at the end of the first period of time; and

(c) the microbes are cultured for a second period of time in the presence of the at least one other fixed carbon source.

188. A microalgae cell containing an exogenous gene, wherein the exogenous gene encodes a protein selected from the group consisting of a lipase, a sucrose transporter, a sucrose invertase, a fructokinase, or a polysaccharide-degrading enzyme.

189. The microalgae cell of claim 188, wherein the cell is selected from the microorganisms in Table 1.

190. The microalgae cell of claim 189, wherein the cell is a species of the genus *Chlorella*.

191. The microalgae cell of claim 190, wherein the species is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis,*

Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella, and *Chlorella zofingiensis.*

192. The microalgae cell of claim 191, wherein the cell is *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides.*

193. The microalgae cell of claim 188, wherein the exogenous gene is in operable linkage with a promoter.

194. The microalgae cell of claim 193, wherein the promoter is inducible or repressible in response to a stimulus.

195. The microalgae cell of claim 194, wherein the stimulus is selected from the group consisting of an exogenously provided small molecule, heat, cold, and light.

196. The microalgae cell of claim 188, wherein the exogenous gene is expressed in a cellular compartment.

197. The microalgae cell of claim 196, wherein the cellular compartment is selected from the group consisting of a chloroplast and a mitochondrion.

198. The microalgae cell of claim 188, wherein the gene encodes a lipase that has at least 70% amino acid identity with a lipase selected from Table 9.

199. The microalgae cell of claim 198, wherein the lipase is novozym-435.

200. The microalgae cell of claim 188, wherein the gene encodes a polysaccharide-degrading enzyme.

201. The microalgae cell of claim 200, wherein the polysaccharide-degrading enzyme is endogenous to a *Chlorella* virus.

202. A microalgae cell containing two exogenous genes, wherein a first exogenous gene encodes a lipase and a second exogenous gene encodes a polysaccharide-degrading enzyme.

203. The microalgae cell of claim 202, wherein the exogenous genes are each in operable linkage with a promoter.

204. The microalgae cell of claim 203, wherein the exogenous genes are each in operable linkage with promoters that are inducible in response to a stimulus.

205. The microalgae cell of claim 204, wherein the exogenous genes are each in operable linkage with promoters that are inducible in response to the same stimulus.

206. The microalgae cell of claim 204, wherein the exogenous genes are each in operable linkage with a promoter that is inducible in response to at least one stimulus that does not induce the other promoter.

207. A method of manufacturing a lipid molecule in a microbe, the method comprising:

(a) culturing the microbe for a first period of time sufficient to increase the cell density, wherein the microbe contains:

(i) an exogenous gene encoding a lipase; and/or

(ii) an exogenous gene encoding a polysaccharide-degrading enzyme;

wherein the exogenous gene(s) are in operable linkage with a promoter that is inducible in response to a stimulus;

(b) providing the stimulus; and

(c) incubating the microbe for a second period of time in the presence of the stimulus.

208. A method of manufacturing a lipid molecule in a microbe, the method comprising:

(a) culturing a lipid-producing microbe for a first period of time sufficient to increase the cell density;

(b) providing a virus capable of infecting and lysing the microbe when in direct contact with the microbe; and

(c) incubating the microbe for a second period of time to produce lysed aqueous biomass.

209. The method of claim 208, further comprising the step of extracting lipid molecules from the lysed aqueous biomass.

210. A microalgae cell containing an exogenous gene, wherein the exogenous gene encodes a cofactor for a lipid pathway enzyme or encodes a protein that participates in the synthesis of the cofactor.

211. A method of culturing a lipid-producing microbe, the method comprising culturing the microbe in the presence of a sufficient amount of one or more cofactor(s) for a lipid pathway enzyme to increase microbial lipid yield over microbial lipid yield in the absence of said one or more cofactors.

212. The method of claim 211, wherein said one or more cofactors is a vitamin required by one or more lipid pathway enzymes.

213. The method of claim 211, wherein said one or more cofactors is biotin.

214. The method of claim 211, wherein said one or more cofactors is/are provided by including in the culture a microbe that has been genetically engineered to produce said one or more cofactors.

215. A method of fermenting a microorganism comprising providing a mixture comprising glucose and xylose as an energy source to the microorganism.

216. The method of claim 215, wherein the mixture further comprises lignin.

217. The method of claim 215, wherein the mixture further comprises at least one species of furfural.

218. The method of claim 215, wherein the mixture is depolymerized cellulosic material.

219. The method of claim 215, wherein the microorganism is a microalgae.

220. The method of claim 219, wherein the microalgae is selected from Table 1.

221. The method of claim 220, wherein the microalgae is a species of the genus *Chlorella*.

222. The method of claim 221, wherein the microalgae is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella,* and *Chlorella zofingiensis*.

223. The method of claim 220, wherein the microalgae is selected from the group consisting of *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,* and *Pseudochlorella aquatica*.

224. The method of claim 215, wherein the microorganism is an oleaginous yeast.

225. The method of claim 224, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

226. The method of claim 215, wherein the microorganism is a fungus.

227. The method of claim 226, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium.*

228. The method of claim 215, wherein the mixture further comprises at least one sucrose utilization enzyme.

229. The method of claim 228, wherein the microorganism is of the genus *Chlorella.*

230. The method of claim 215, wherein the microorganism has been genetically engineered to express an exogenous gene encoding at least one lipid modification enzyme, hydrocarbon modification enzyme, or sucrose utilization enzyme.

231. The method of claim 228, wherein the mixture comprises a sucrose invertase.

232. A method of culturing a microalgae comprising culturing the microalgae in a culture medium including a feedstock comprising at least one carbon substrate selected from the group consisting of a cellulosic material, a 5-carbon sugar, a 6-carbon sugar, and acetate.

233. The method of claim 232, wherein the carbon substrate is glucose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella, Parachlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus, Prototheca* and *Scenedesmus*.

234. The method of claim 232, wherein the carbon substrate is xylose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella, Pseudochlorella,* and *Prototheca*.

235. The method of claim 232, wherein the carbon substrate is sucrose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella,* and *Bracteococcus*.

236. The method of claim 232, wherein the carbon substrate is fructose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella, Parachlorella, Prototheca,* and *Scenedesmus*.

237. The method of claim 232, wherein the carbon substrate is arabinose and the microalgae is *Chlorella sp.*

238. The method of claim 232, wherein the carbon substrate is mannose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella, Parachlorella, Bracteococcus, Prototheca,* and *Scenedesmus*.

239. The method of claim 232, wherein the carbon substrate is galactose and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Bracteococcus, Parachlorella, , Chlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus,* and *Prototheca*.

240. The method of claim 232, wherein the carbon substrate is acetate and the microalgae is of a genus selected from the group consisting of *Chlorella, Parachlorella,* and *Prototheca*.

241. The method of claim 232, wherein the culture medium further includes at least one sucrose utilization enzyme.

242. The method of claim 241, wherein the microalgae is of the genus *Chlorella*.

243. The method of claim 242, wherein the microalgae has been genetically engineered to express an exogenous gene encoding at least one lipid modification enzyme, hydrocarbon modification enzyme, or sucrose utilization enzyme.

244. The method of claim 241, wherein the culture medium includes a sucrose invertase.

245. The method of claim 232, wherein the microalgae is selected from Table 1.

246. A method of culturing microalgae comprising placing a plurality of microalgae cells in the presence of depolymerized cellulosic material.

247. The method of claim 246, wherein the microalgae are cultured in the presence of an additional fixed carbon source selected from the group consisting of glycerol, sucrose, glucose, arabinose, galactose, xylose, fructose, arabinose, mannose, acetate, and any combination of the foregoing.

248. The method of claim 246, wherein the microalgae is selected from a species of the genus *Bracteococcus,* a species of the genus *Chlorella,* a species of the genus *Parachlorella,* a species of the genus *Prototheca,* or a species of the genus *Pseudochlorella.*

249. The method of claim 248, wherein the microalgae is selected from *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,* and *Pseudochlorella aquatica.*

250. The method of claim 246, wherein the microalgae are cultured in the presence of at least sucrose utilization enzyme.

251. The method of claim 250, wherein the microalgae is of the genus *Chlorella.*

252. The method of claim 246, wherein the microalgae has been genetically engineered to express an exogenous gene encoding at least one lipid modification enzyme, hydrocarbon modification enzyme, or sucrose utilization enzyme.

253. The method of claim 250, wherein the at least one sucrose utilization enzyme is a sucrose invertase.

254. The method of claim 252, wherein the at least one lipid modification enzyme is selected from a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

255. The method of claim 252, wherein the at least one hydrocarbon modification enzyme is selected from a fatty acyl-ACP thioesterase, a fatty acyl-CoA reductase, a fatty aldehyde reductase, a fatty acyl-CoA/aldehyde reductase, a fatty aldehyde decarbonylase, and an acyl carrier protein.

256. A method of culturing a lipid-producing microbe, the method comprising culturing the microbe in the presence of acetic acid and the absence of a fixed nitrogen source.

257. The method of claim 256, wherein the microbe is cultured in the presence of a sufficient amount of acetic acid to increase microbial lipid yield over microbial lipid yield in the absence of acetic acid, wherein culture conditions are otherwise the same between the two cultures.

258. A microbial culture containing:

(a) a population of microorganisms; and

(b) a culture medium comprising glucose, xylose, and a molecule selected from the group consisting of lignin and a species of furfural.

259. The microbial culture of claim 258, wherein the microorganisms are microalgae.

260. The microbial culture of claim 259, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

261. The microbial culture of claim 260, wherein the microorganisms are a species of the genus *Chlorella*.

262. The microbial culture of claim 261, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella*

aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella, and *Chlorella zofingiensis.*

263. The microbial culture of claim 258, wherein the microorganisms are selected from *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,* and *Pseudochlorella aquatica.*

264. The microbial culture of claim 258, wherein the microorganisms are oleaginous yeast.

265. The microbial culture of claim 264, wherein the oleaginous yeast are selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

266. The microbial culture of claim 258, wherein the microorganisms are fungi.

267. The microbial culture of claim 266, wherein the fungi are selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus,*

Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum, a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

268. The microbial culture of claim 258, wherein the microorganisms contain at least one exogenous sucrose utilization gene.

269. The microbial culture of claim 268, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

270. The microbial culture of claim 258, wherein the microorganisms contain at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

271. The microbial culture of claim 270, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

272. A method of biodiesel manufacturing, the method comprising:

(a) culturing a lipid-producing microorganism in a first microbial culture;

(b) recovering lipid from the biomass produced by the first microbial culture;

(c) subjecting the lipid to transesterification to produce fatty acid ester(s) and glycerol; and

(d) adding the glycerol to a second microbial culture.

273. The method of claim 272, wherein the first and second microbial cultures are cultures of the same species of microorganism.

274. The method of claim 272, wherein the microorganism is a microalgae.

275. The method of claim 274, wherein the microorganism is selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

276. The method of claim 275, wherein the microorganism is a species of the genus *Chlorella*.

277. The method of claim 276, wherein the microorganism is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella,* and *Chlorella zofingiensis.*

278. The method of claim 272, wherein the second microbial culture comprises microorganisms selected from the group consisting of *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* and *Chlorella sorokiniana.*

279. The method of claim 272, wherein the microorganism is an oleaginous yeast.

280. The method of claim 279, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

281. The method of claim 272, wherein the microorganism is a fungus.

282. The method of claim 281, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus

Chaetomium, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

283. The method of claim 272, wherein the microorganism contains at least one exogenous sucrose utilization gene.

284. The method of claim 283, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

285. The method of claim 272, wherein the microorganism contains at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

286. The method of claim 285, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

287. A method of fermentation comprising culturing a microorganism in the presence of glycerol and at least one other fixed carbon source.

288. The method of claim 287, wherein the glycerol and the at least one other fixed carbon source are provided to the microorganism simultaneously at a predetermined ratio.

289. The method of claim 288, wherein all of the glycerol and the at least one other fixed carbon source are provided to the microorganism at the beginning of the fermentation.

290. The method of claim 288, wherein all of the glycerol and the at least one other fixed carbon source are fed to the microorganism at a predetermined rate over the course of the fermentation.

291. The method of claim 287, wherein

(a) glycerol is provided to the microorganism in the absence of the at least one other fixed carbon source for a first period of time;

(b) the at least one other fixed carbon source is provided at the end of the first period of time; and

(c) the microorganism is cultured for a second period of time in the presence of the at least one other fixed carbon source.

292. The method of claim 291, wherein the at least one other fixed carbon source is fed to the microorganism at a predetermined rate during the second period of time.

293. The method of claim 291, wherein all of the at least one other fixed carbon source is provided to the microorganism at the end of the first period of time.

294. The method of claim 287, wherein

(a) the at least one other fixed carbon source is provided to the microorganism in the absence of glycerol for a first period of time;

(b) glycerol is provided at the end of the first period of time; and

(c) the microorganism is cultured for a second period of time in the presence of glycerol.

295. The method of claim 287, wherein the microorganism is a microalgae.

296. The method of claim 295, wherein the microalgae is selected from Table 1.

297. The method of claim 295, wherein the microalgae is of the genus *Chlorella*.

298. The method of claim 297, wherein the microalgae is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella, and *Chlorella zofingiensis.*

299. The method of claim 287, wherein the microorganism is an oleaginous yeast.

300. The method of claim 299, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

301. The method of claim 287, wherein the microorganism is a fungus.

302. The method of claim 301, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

303. The method of claim 287, wherein the microorganism contains at least one exogenous sucrose utilization gene.

304. The method of claim 303, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

305. The method of claim 287, wherein the microorganism contains at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

306. The method of claim 305, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

307. The method of claim 287, wherein the glycerol is a byproduct of a transesterification process.

308. The method of claim 307, wherein the glycerol is acidulated.

309. The method of claim 307, wherein the glycerol is non-acidulated.

310. The method of claim 287, wherein the at least one other fixed carbon source is glucose.

311. The method of claim 287, wherein the at least one other fixed carbon source is depolymerized cellulosic material.

312. The method of claim 287, wherein the at least one other fixed carbon source is sucrose.

313. A fermentor comprising:

(a) a population of microorganisms;

(b) glycerol; and

(c) at least one sugar selected from the group consisting of xylose, glucose, and sucrose.

314. The fermentor of claim 313, wherein the glycerol is a byproduct of a lipid transesterification process.

315. The fermentor of claim 313, wherein the microorganisms are microalgae.

316. The fermentor of claim 315, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

317. The fermentor of claim 316, wherein the microorganisms are a species of the genus *Chlorella*.

318. The fermentor of claim 317, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima,*

Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella, and *Chlorella zofingiensis.*

319. The fermentor of claim 313, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* and *Chlorella sorokiniana.*

320. The fermentor of claim 313, wherein the microorganisms are oleaginous yeast.

321. The fermentor of claim 320, wherein the oleaginous yeast are selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

322. The fermentor of claim 313, wherein the microorganisms are fungi.

323. The fermentor of claim 322, wherein the fungi are selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium.*

324. The fermentor of claim 313, wherein the microorganisms contain at least one exogenous sucrose utilization gene.

325. The fermentor of claim 324, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

326. The fermentor of claim 313, wherein the microorganisms contain at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

327. The fermentor of claim 326, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

328. A method of fermenting a microorganism comprising providing byproduct glycerol from a transesterification process as a sole source of fixed carbon energy.

329. The method of claim 328, wherein no light energy is provided to the microorganism.

330. The method of claim 328, wherein light energy is provided to the microorganism.

331. The method of claim 328, wherein the microorganism is a microalgae.

332. The method of claim 331, wherein the microorganism is selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

333. The method of claim 332, wherein the microorganism is a species of the genus *Chlorella*.

334. The method of claim 333, wherein the microorganism is selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella*

pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella, and *Chlorella zofingiensis.*

335. The method of claim 328, wherein the microorganism is selected from *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.,* and *Chlorella sorokiniana.*

336. The method of claim 328, wherein the microorganism is an oleaginous yeast.

337. The method of claim 336, wherein the oleaginous yeast is selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

338. The method of claim 328, wherein the microorganism is a fungus.

339. The method of claim 338, wherein the fungus is selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

340. The method of claim 328, wherein the microorganism contains at least one exogenous sucrose utilization gene.

341. The method of claim 340, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

342. The method of claim 328, wherein the microorganism contains at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

343. The method of claim 342, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

344. A microorganism containing an exogenous sucrose utilization gene.

345. The microorganism of claim 344, wherein the gene encodes a sucrose transporter.

346. The microorganism of claim 344, wherein the gene encodes a sucrose invertase.

347. The microorganism of claim 344, wherein the gene encodes a fructokinase.

348. The microorganism of claim 344, wherein the microorganism is a microalgae.

349. The microorganism of claim 348, wherein the microorganism is selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

350. The microorganism of claim 349, wherein the microorganism is a species of the genus *Chlorella*.

351. The microorganism of claim 350, wherein the microorganism is a species selected from the group consisting of *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.*, or *Chlorella protothecoides*.

352. A cell of the species *Chlorella protothecoides, Chlorella emersonii, or Chlorella minutissima* wherein the cell contains an exogenous gene.

353. The cell of claim 352, wherein the exogenous gene encodes a protein selected from the group consisting of a sucrose transporter, a sucrose invertase, a lipid modification enzyme, a hydrocarbon modification enzyme and a fructokinase.

354. The cell of claim 353, wherein the protein is a sucrose invertase secreted into the extracellular space.

355. The cell of claim 353, wherein the protein is a sucrose invertase targeted to the cytoplasm.

356. A microbial culture containing:

(a) a population of microorganisms; and

(b) a culture medium comprising (i) sucrose, and (ii) a sucrose invertase enzyme.

357. The microbial culture of claim 356, wherein the microorganisms are microalgae.

358. The microbial culture of claim 357, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

359. The microbial culture of claim 358, wherein the microorganisms are a species of the genus *Chlorella*.

360. The microbial culture of claim 359, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella,* and *Chlorella zofingiensis*.

361. The microbial culture of claim 356, wherein the microorganisms are oleaginous yeast.

362. The microbial culture of claim 361, wherein the oleaginous yeast are selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica.*

363. The microbial culture of claim 356, wherein the microorganisms are fungi.

364. The microbial culture of claim 363, wherein the fungi are selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium.*

365. The microbial culture of claim 356, wherein the microorganisms contain at least one exogenous sucrose utilization gene.

366. The microbial culture of claim 365, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

367. The microbial culture of claim 366, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter.

368. The microbial culture of claim 356, wherein the sucrose invertase enzyme is a secrectable sucrose invertase enzyme encoded by an exogenous sucrose invertase gene expressed by the population of microorganisms.

369. The microbial culture of claim 356, wherein the microorganisms contain at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

370. The microbial culture of claim 369, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

371. A microbial culture containing:

(a) a population of microorganisms; and

(b) a culture medium comprising (i) molasses, and (ii) a sucrose invertase enzyme.

372. The microbial culture of claim 371, wherein the microorganisms are microalgae.

373. The microbial culture of claim 372, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

374. The microbial culture of claim 373, wherein the microorganisms are a species of the genus *Chlorella*.

375. The microbial culture of claim 374, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella,* and *Chlorella zofingiensis*.

376. The microbial culture of claim 371, wherein the microorganisms are oleaginous yeast.

377. The microbial culture of claim 376, wherein the oleaginous yeast are selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus,*

Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis, and *Yarrowia lipolytica.*

378. The microbial culture of claim 371, wherein the microorganisms are fungi.

379. The microbial culture of claim 378, wherein the fungi are selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

380. The microbial culture of claim 371, wherein the microorganisms contain at least one exogenous sucrose utilization gene.

381. The microbial culture of claim 380, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

382. The microbial culture of claim 381, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter.

383. The microbial culture of claim 371, wherein the sucrose invertase enzyme is a secrectable sucrose invertase enzyme encoded by an exogenous sucrose invertase gene expressed by the population of microorganisms.

384. The microbial culture of claim 371, wherein the microorganisms contain at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

385. The microbial culture of claim 384, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

386. A microbial culture containing:

(a) a population of microorganisms; and

(b) a culture medium comprising (i) sucrose; (ii) lignin; and (iii) a sucrose invertase enzyme.

387. The microbial culture of claim 386, wherein the microorganisms are microalgae.

388. The microbial culture of claim 387, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1.

389. The microbial culture of claim 388, wherein the microorganisms are a species of the genus *Chlorella*.

390. The microbial culture of claim 389, wherein the microorganisms are selected from the group consisting of *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella,* and *Chlorella zofingiensis*.

391. The microbial culture of claim 386, wherein the microorganisms are oleaginous yeast.

392. The microbial culture of claim 391, wherein the oleaginous yeast are selected from the group consisting of *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis,* and *Yarrowia lipolytica*.

393. The microbial culture of claim 386, wherein the microorganisms are fungi.

394. The microbial culture of claim 393, wherein the fungi are selected from the group consisting of a species of the genus *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum,* a species of the genus *Hensenulo*, a species of the genus *Chaetomium*, a species of the genus *Cladosporium*, a species of the genus *Malbranchea*, a species of the genus *Rhizopus*, and a species of the genus *Pythium*.

395. The microbial culture of claim 386, wherein the microorganisms contain at least one exogenous sucrose utilization gene.

396. The microbial culture of claim 395, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter, a sucrose invertase, a hexokinase, a glucokinase, or a fructokinase.

397. The microbial culture of claim 396, wherein the sucrose utilization gene encodes a sucrose transporter.

398. The microbial culture of claim 386, wherein the sucrose invertase enzyme is a secrectable sucrose invertase enzyme encoded by an exogenous sucrose invertase gene expressed by the population of microorganisms.

399. The microbial culture of claim 386, wherein the microorganisms contain at least one exogenous gene encoding a lipid pathway enzyme.

400. The microbial culture of claim 399, wherein the lipid pathway enzyme is selected from the group consisting of a stearoyl-ACP desaturase, a glycerolipid desaturase, a pyruvate dehydrogenase, an acetyl-CoA carboxylase, an acyl carrier protein, and a glycerol-3 phosphate acyltransferase.

401. A nucleic acid comprising:

(a) a cDNA encoding a sucrose utilization gene; and

(b) a cDNA encoding a protein conferring resistance to the antibiotic hygromycin or the antibiotic G418.

402. A method of cultivating microalgae, comprising:

(a) providing a microalgae cell capable of performing heterotrophic growth;

(b) placing the microalgae cell in growth media, wherein the growth media comprises depolymerized cellulosic material; and

(c) incubating the microalgae for a period of time sufficient to allow the cell to grow.

02-20101H
Cons. I
folio 1

09 - 149183 (Parte 3)

210



Figure 1

211

Figure 2

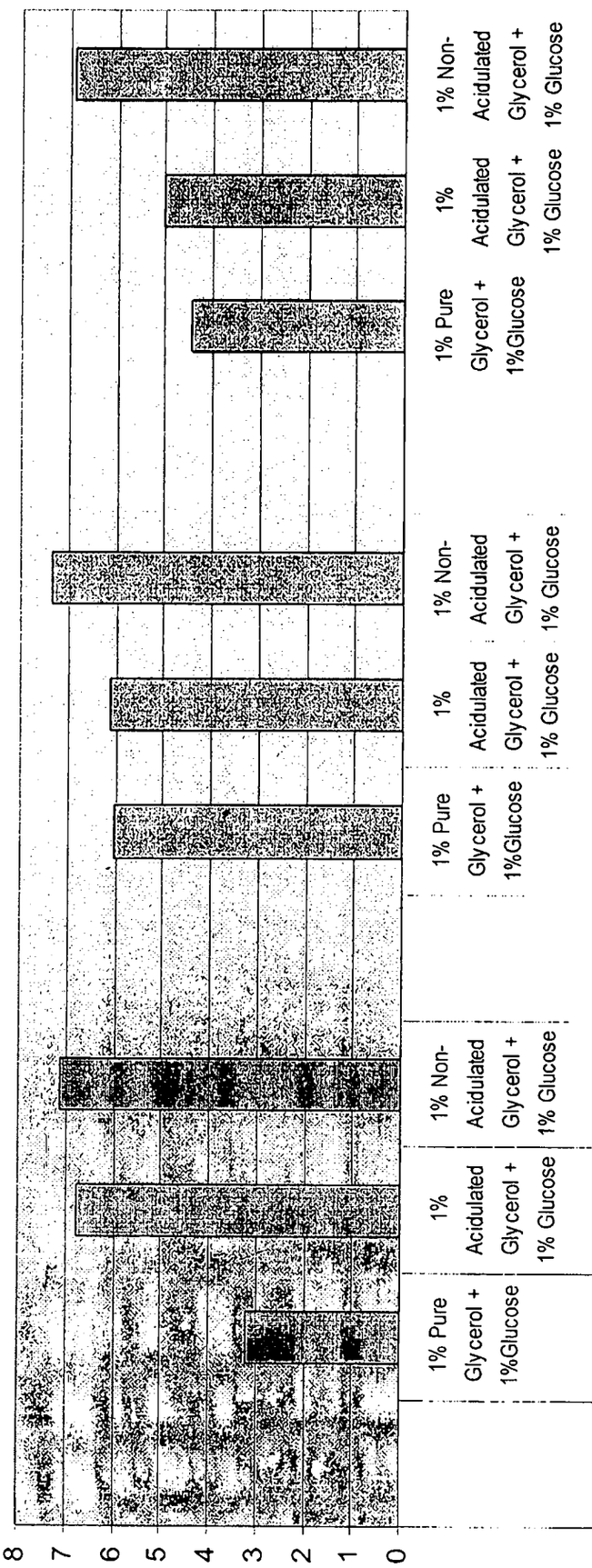
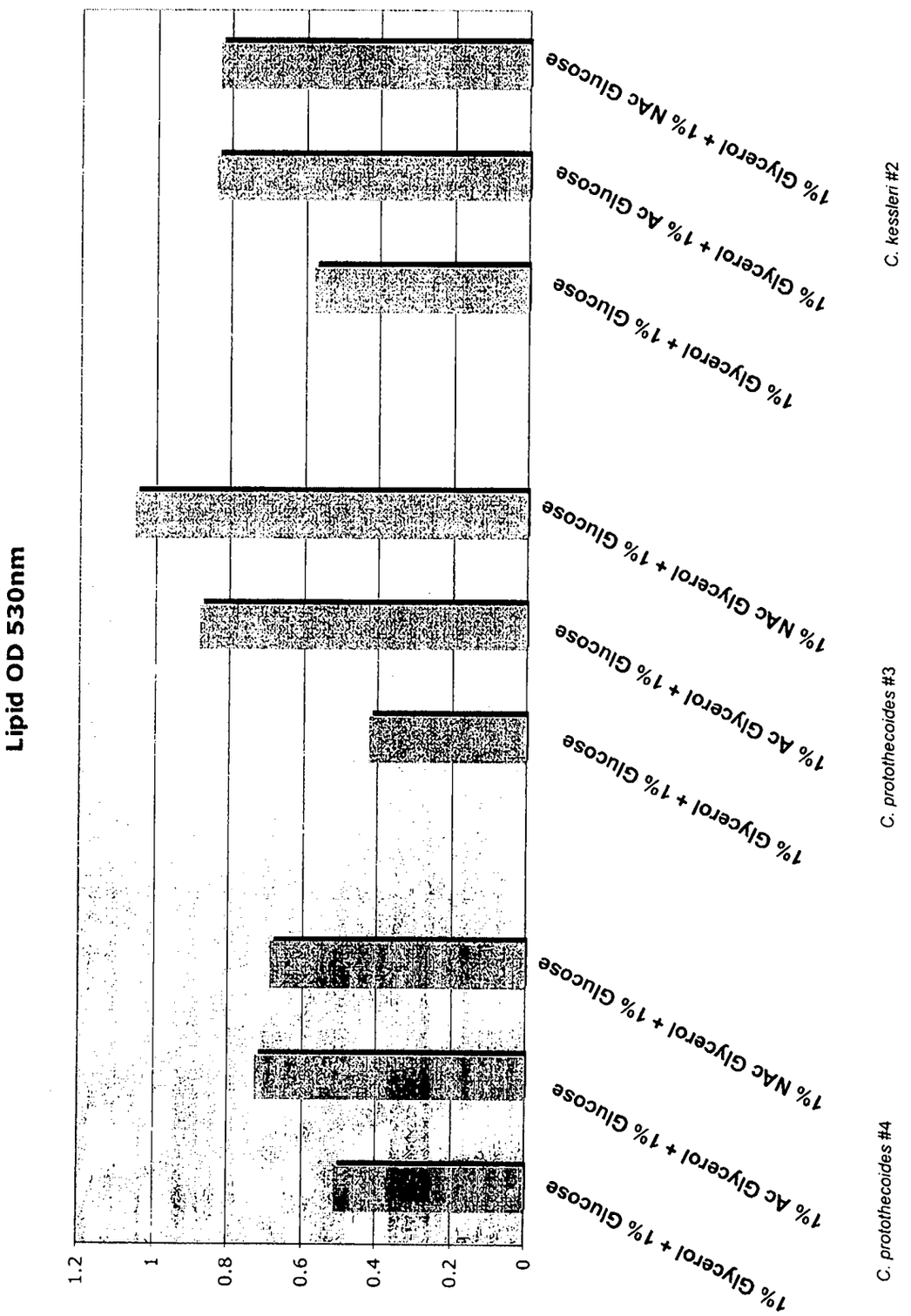

Dry Cell Weight (grams/Liter)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1% Pure Glycerol + 1%Glucose
1% Acidulated Glycerol + 1% Glucose
1% Non-Acidulated Glycerol + 1% Glucose
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1
C. kesslen #2

Figure 3


Lipid OD 530nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
C. protothecoides #4
C. protothecoides #3
C. kessleri #2

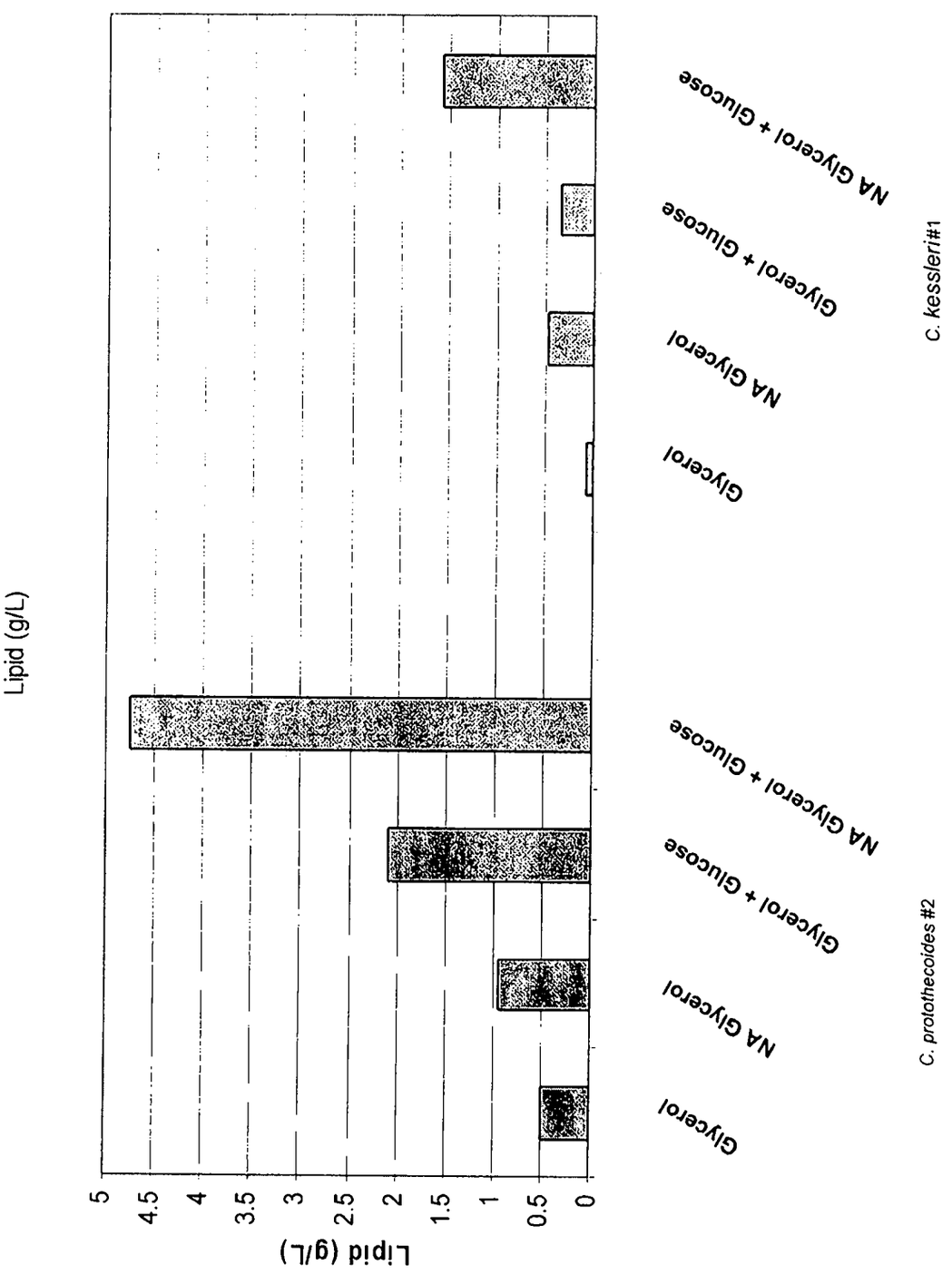
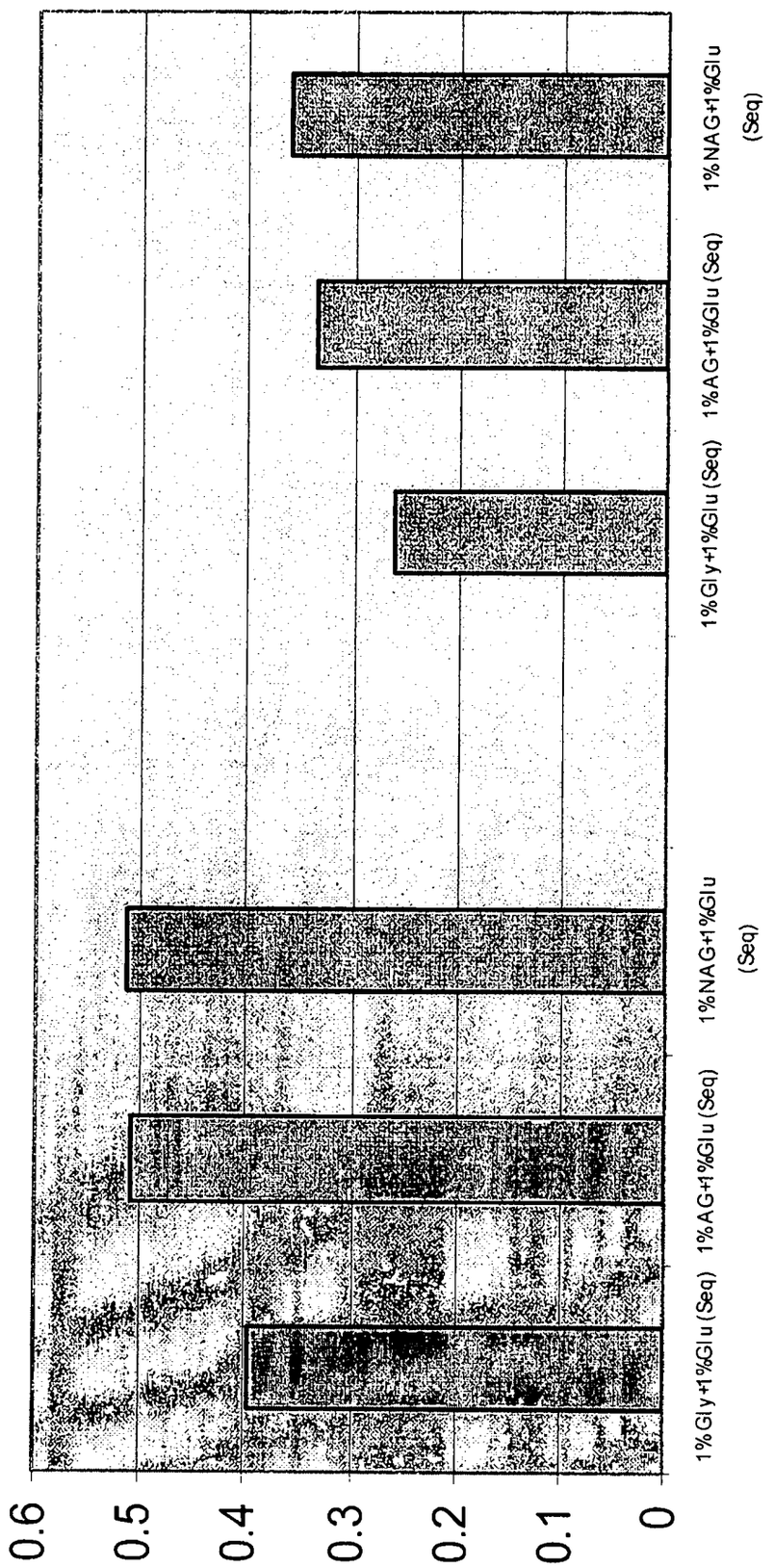

Lipid (g/L)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Lipid (g/L)
Glycerol
NA Glycerol
Glycerol + Glucose
NA Glycerol + Glucose
C. protothecoides #2
Glycerol
NA Glycerol
Glycerol + Glucose
NA Glycerol + Glucose
C. kessleri#1

Figure 4

Figure 5


% Lipid
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1% Gly+1%Glu (Seq)
1%AG+1%Glu (Seq)
1%NAG+1%Glu (Seq)
C. protothecoides #3
1% Gly+1%Glu (Seq)
1%AG+1%Glu (Seq)
1%NAG+1%Glu (Seq)
C. kessleri #2

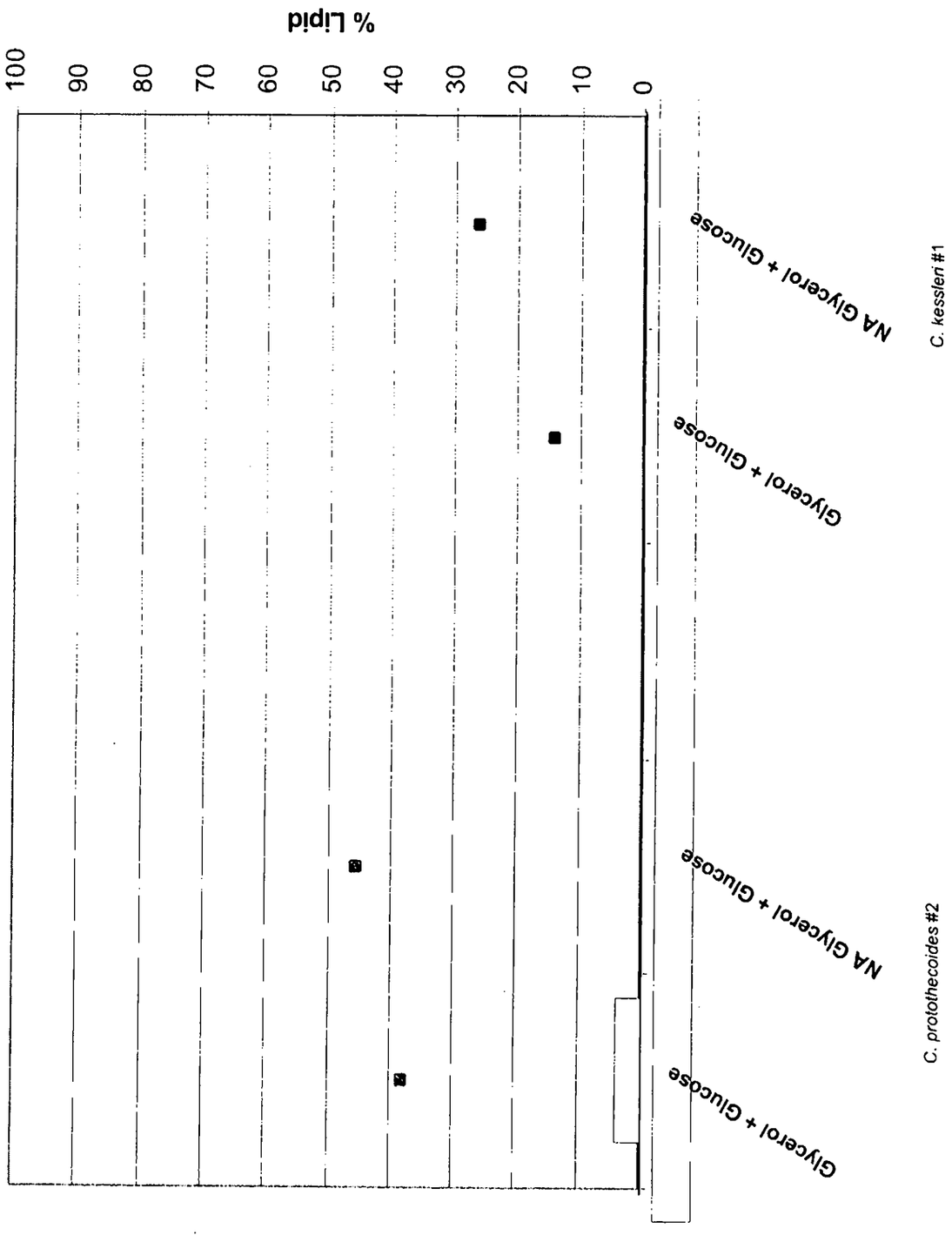

% Lipid
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
NA Glycerol + Glucose
Glycerol + Glucose
NA Glycerol + Glucose
Glycerol + Glucose
C. kesslen #1
C. protothecoides #2

Figure 6

Figure 7

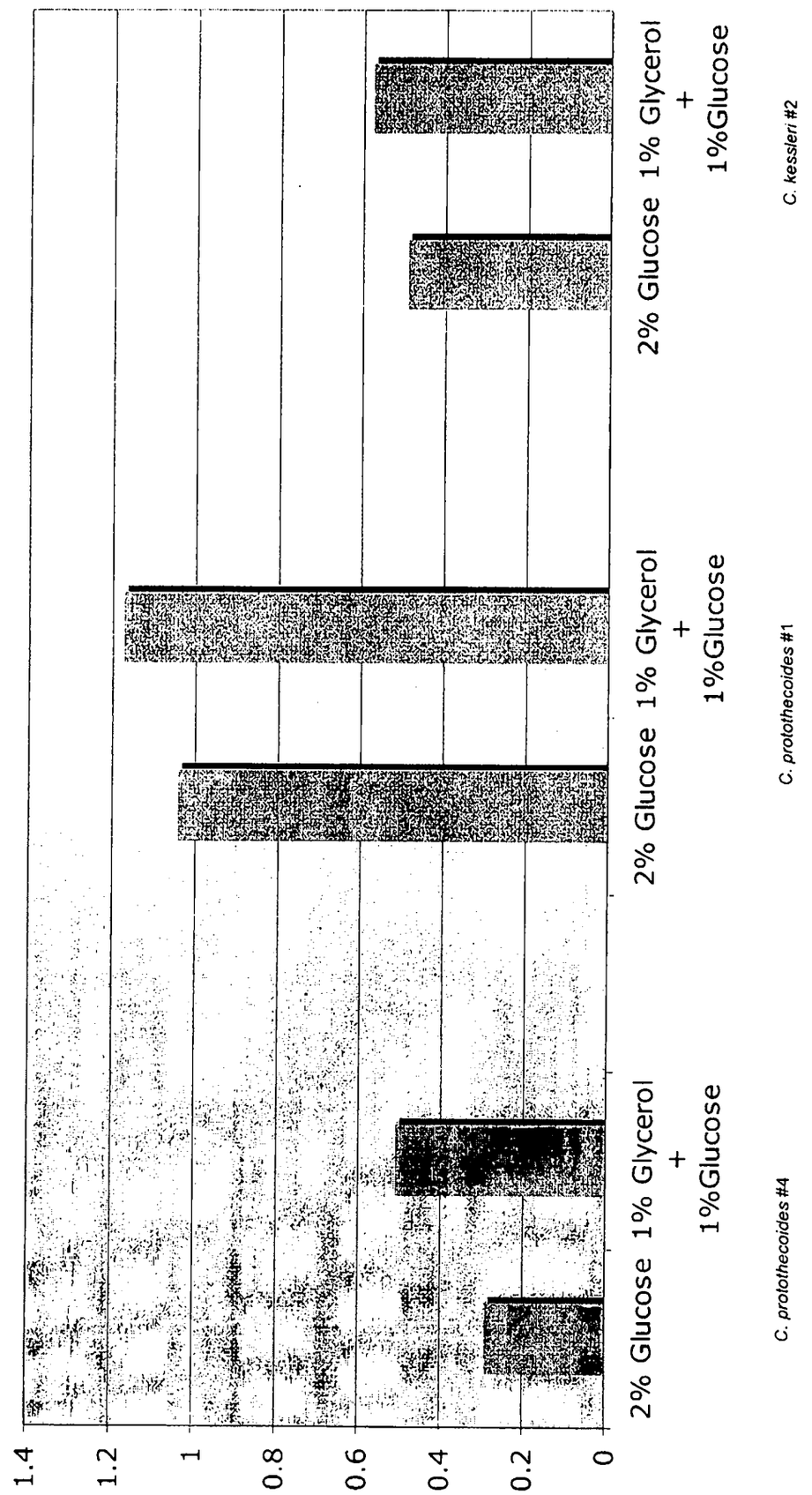

Lipid OD 530nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2% Glucose 1% Glycerol + 1%Glucose
2% Glucose 1% Glycerol + 1%Glucose
2% Glucose 1% Glycerol + 1%Glucose
C. protothecoides #4
C. protothecoides #1
C. kessleri #2

Figure 8

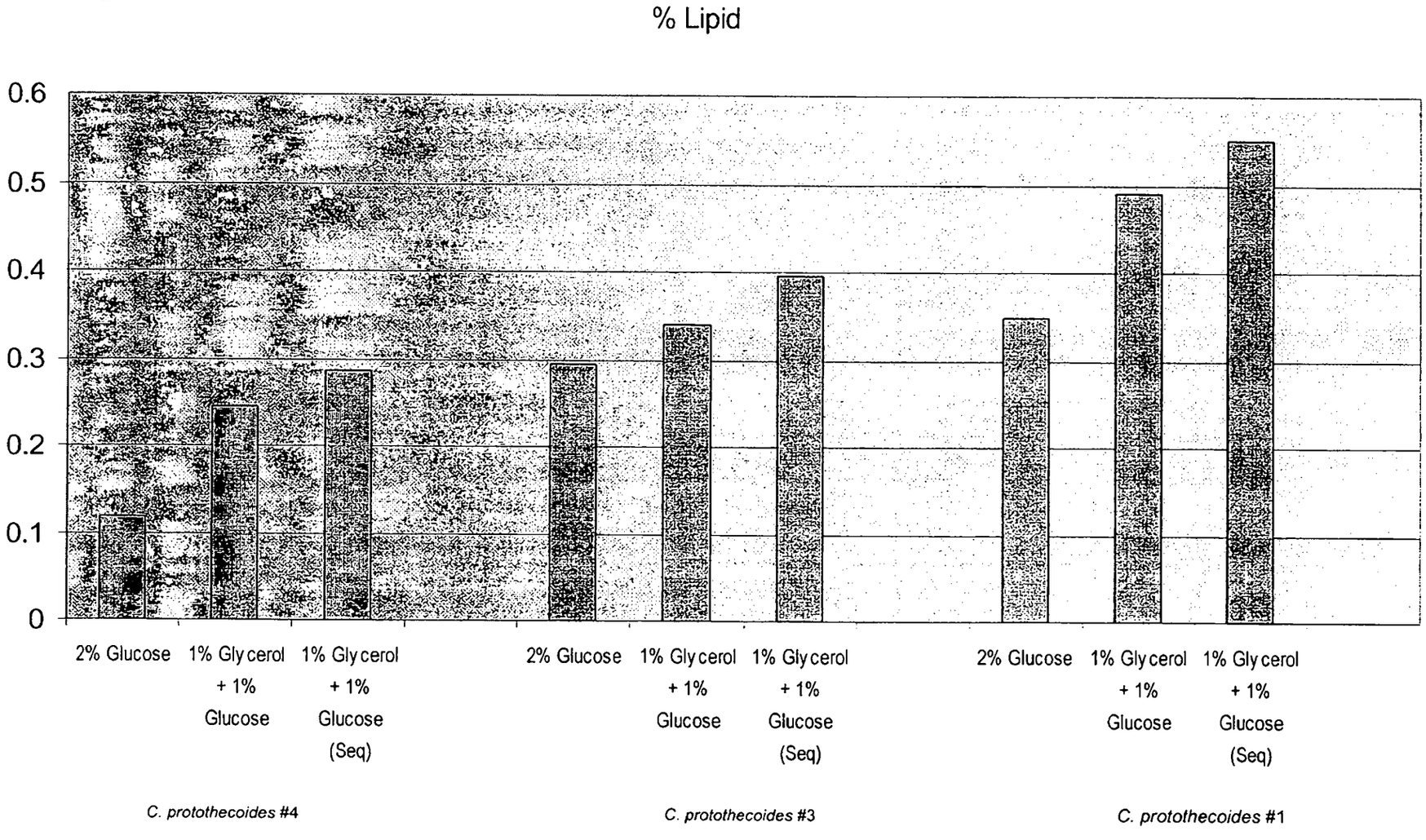
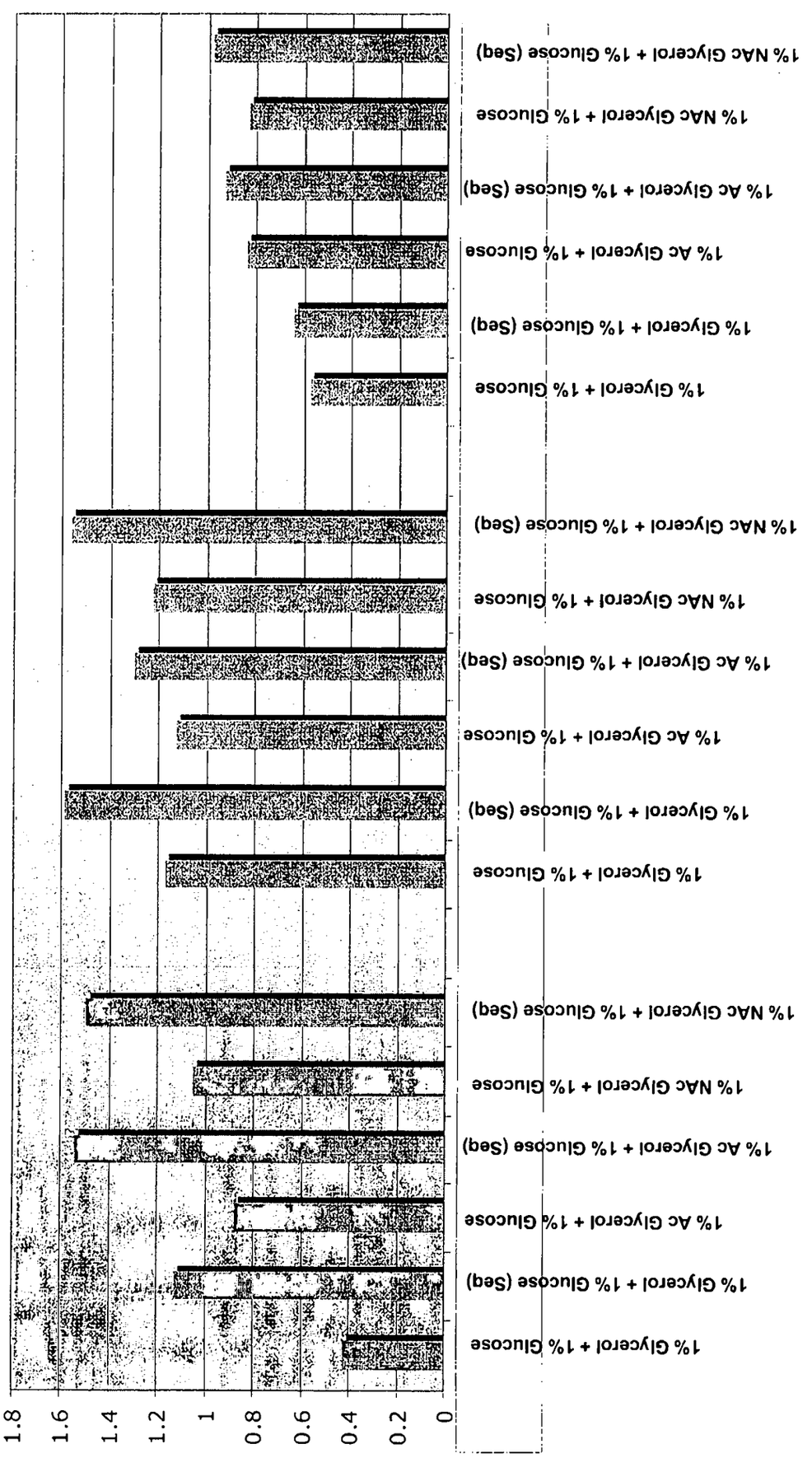

% Lipid
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
2% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
2% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
C. protothecoides #4
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1

Figure 9


Lipid OD 530nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Seq)
C. prototheocoides #3
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Seq)
C. prototheocoides #1
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Seq)
C. kessleri #2

219

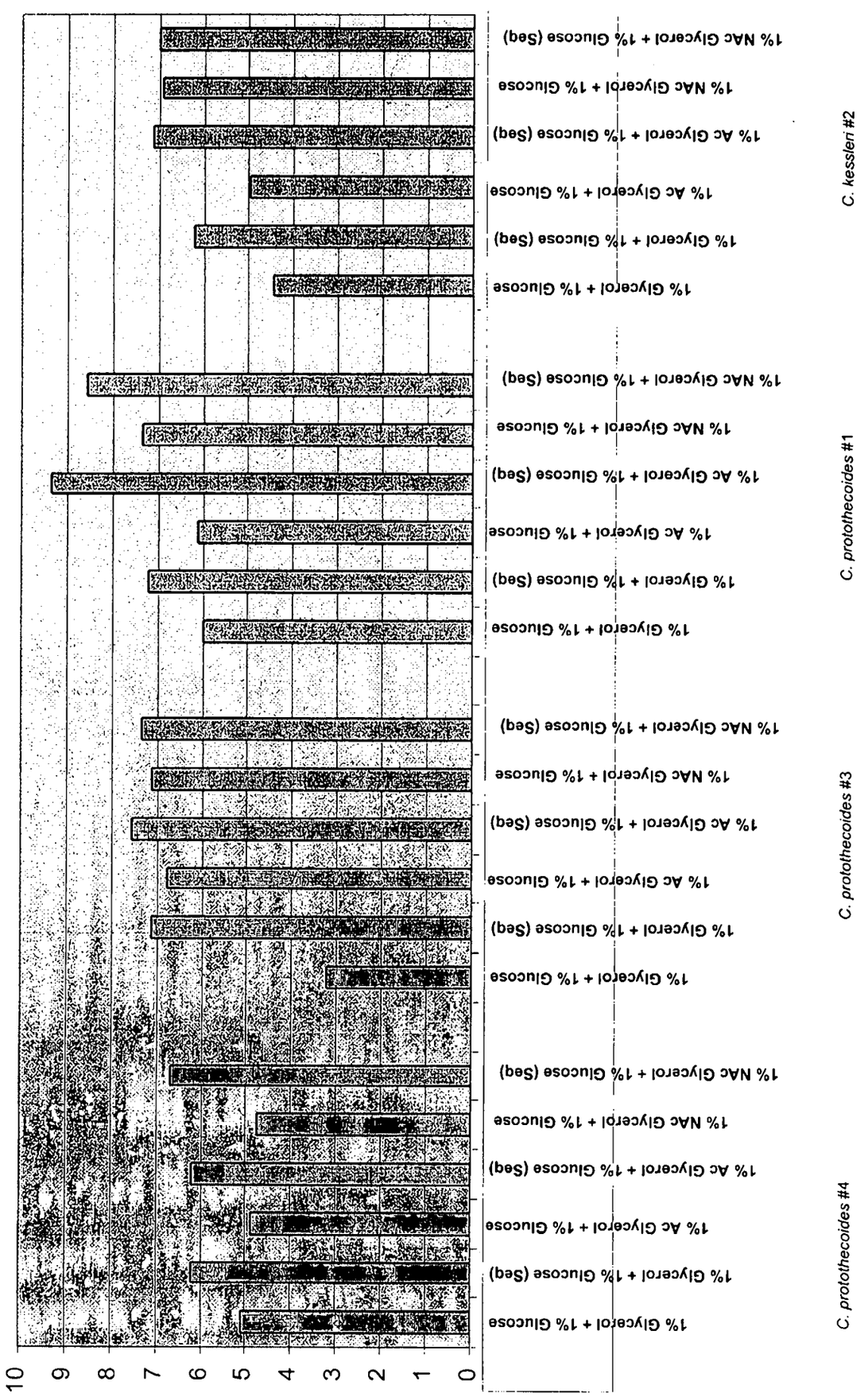
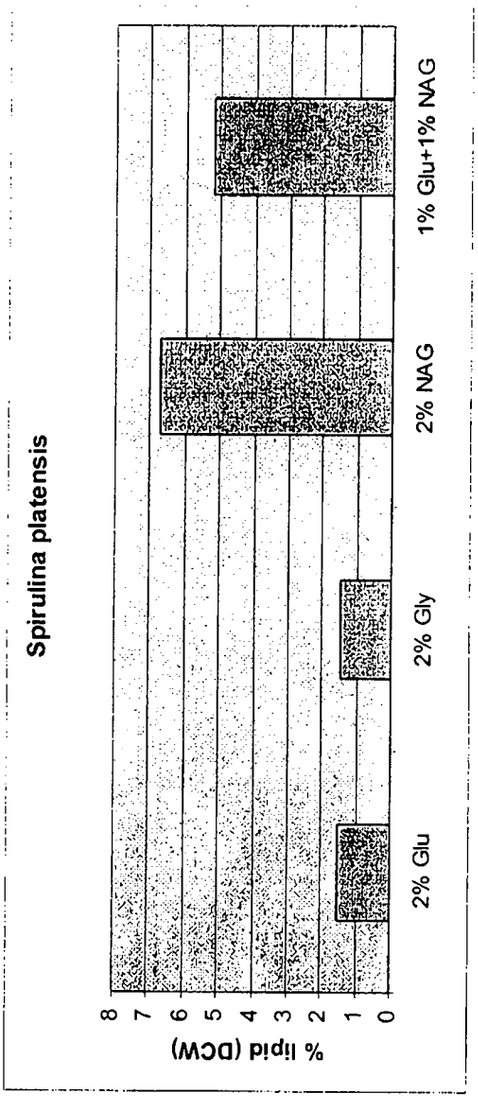


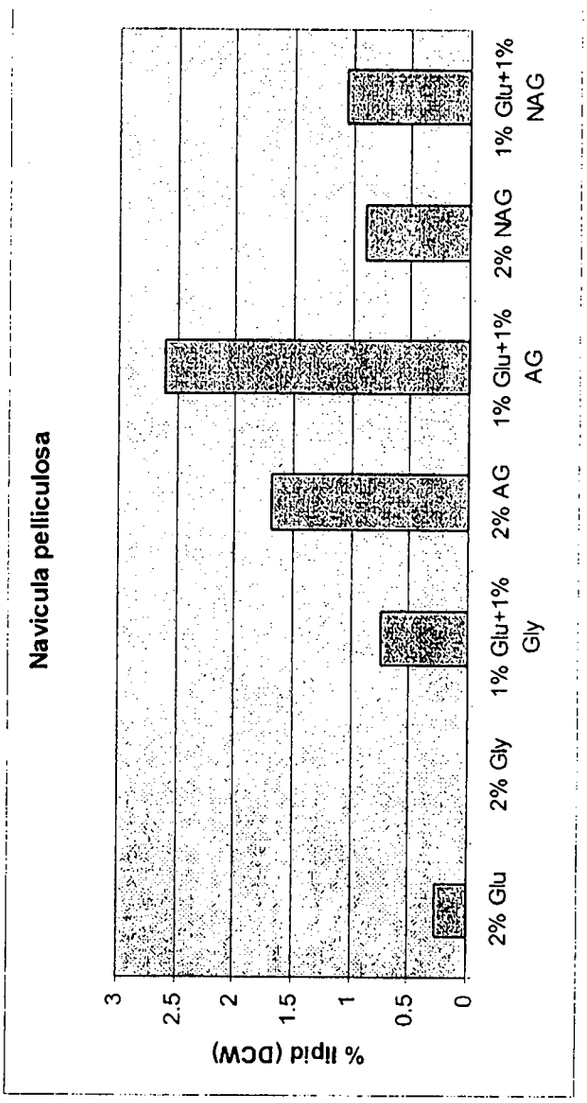
Figure 10

220

Figure 11

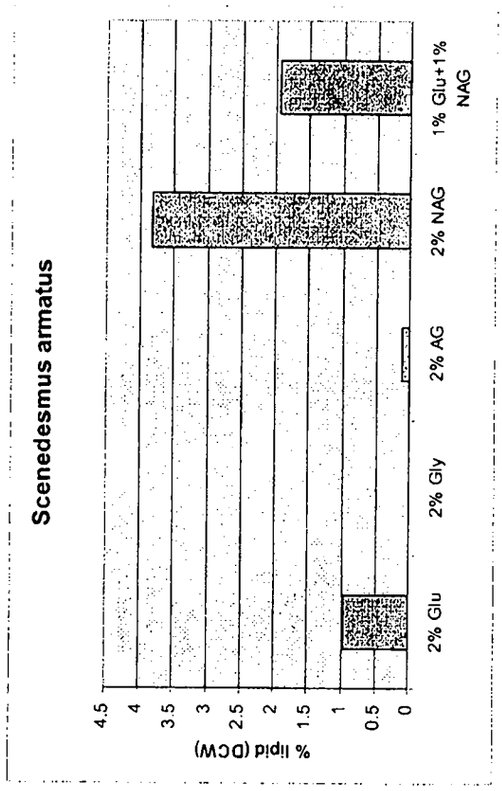


(a)

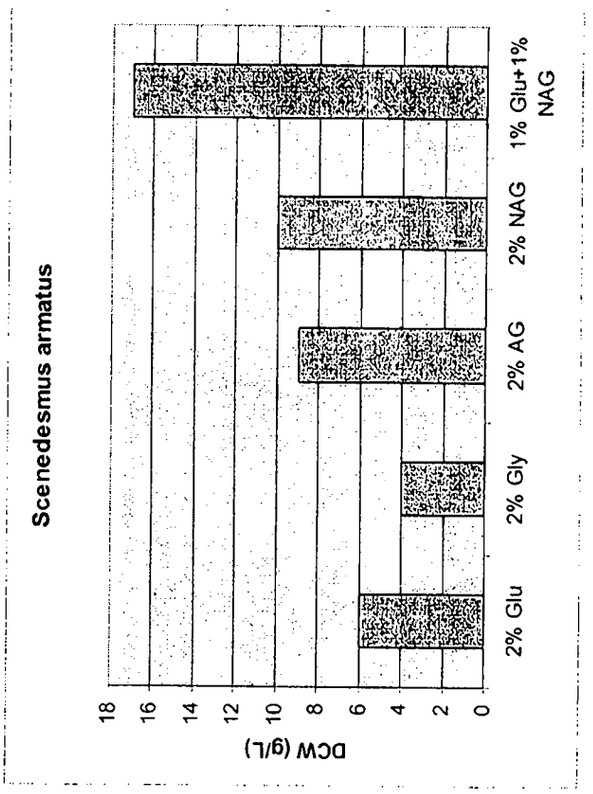


(b)

221



(a)



(b)

Figure 12

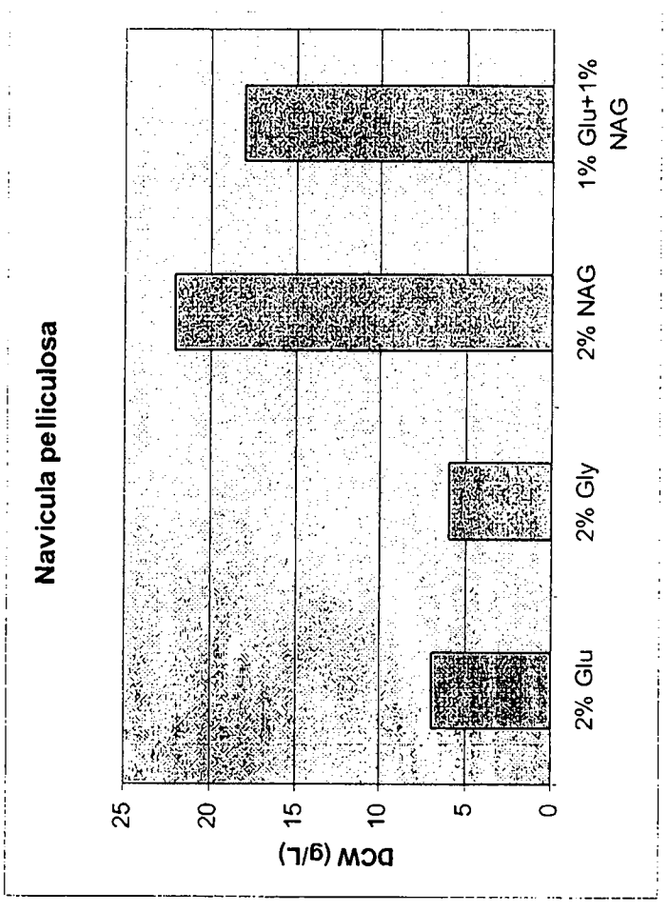
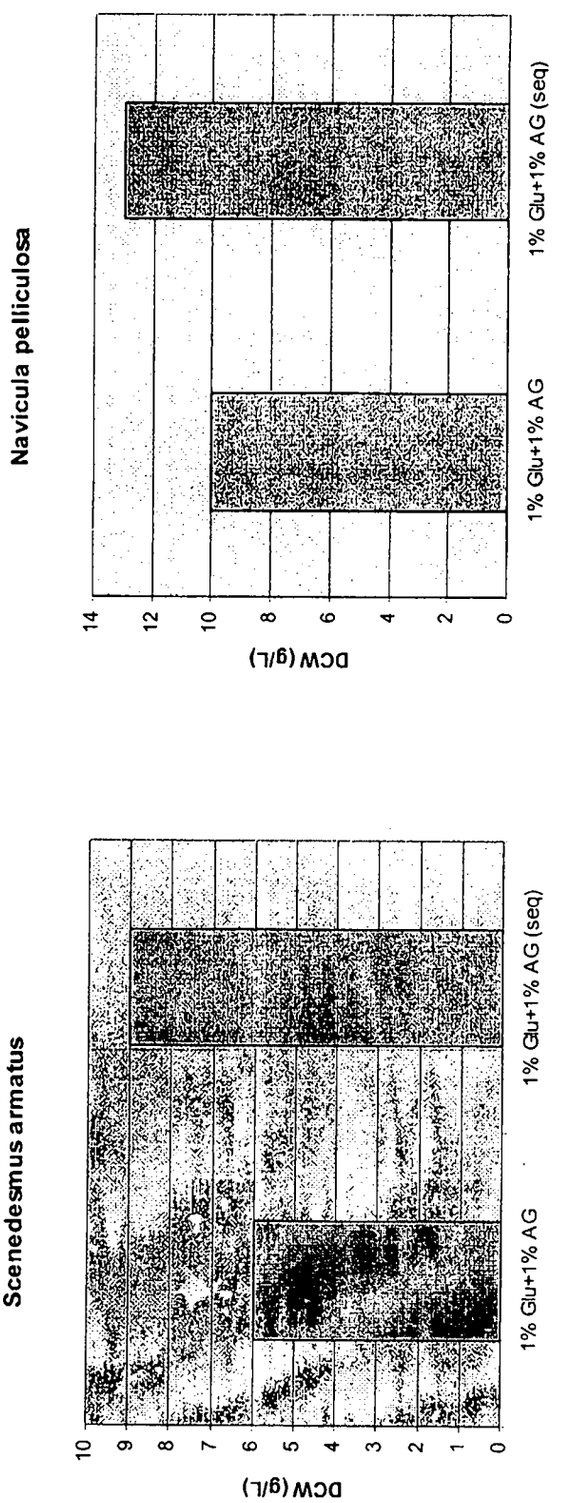

Navicula pelliculosa
DCW (g/L)
25
20
15
10
5
0
2% Glu
2% Gly
2% NAG
1% Glu+1% NAG

Figure 13

Figure 14


(a)
Scenedesmus armatus
DCW (g/L)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1% Glu+1% AG
1% Glu+1% AG (seq)
(b)
Navicula pelliculosa
DCW (g/L)
0
2
4
6
8
10
12
14
1% Glu+1% AG
1% Glu+1% AG (seq)

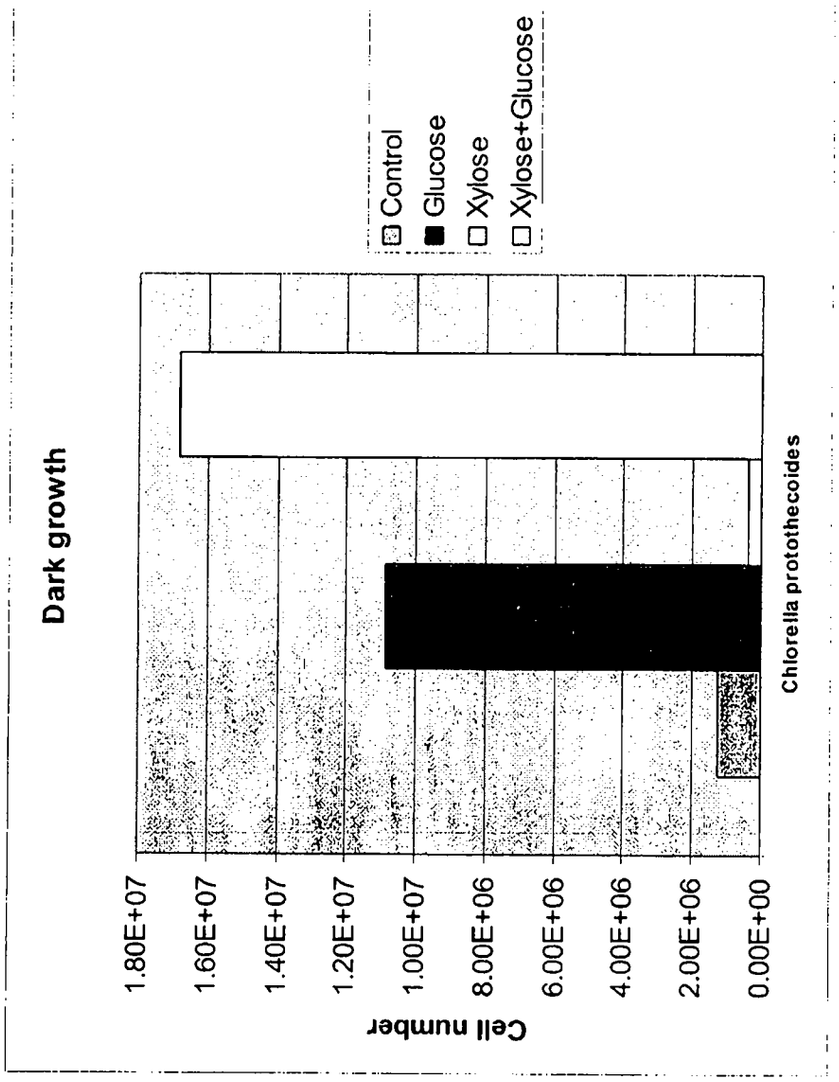

Dark growth
Control
Glucose
Xylose
Xylose+Glucose
Cell number
1.80E+07
1.60E+07
1.40E+07
1.20E+07
1.00E+07
8.00E+06
6.00E+06
4.00E+06
2.00E+06
0.00E+00
Chlorella protothecoides

Figure 15

225

Figure 16

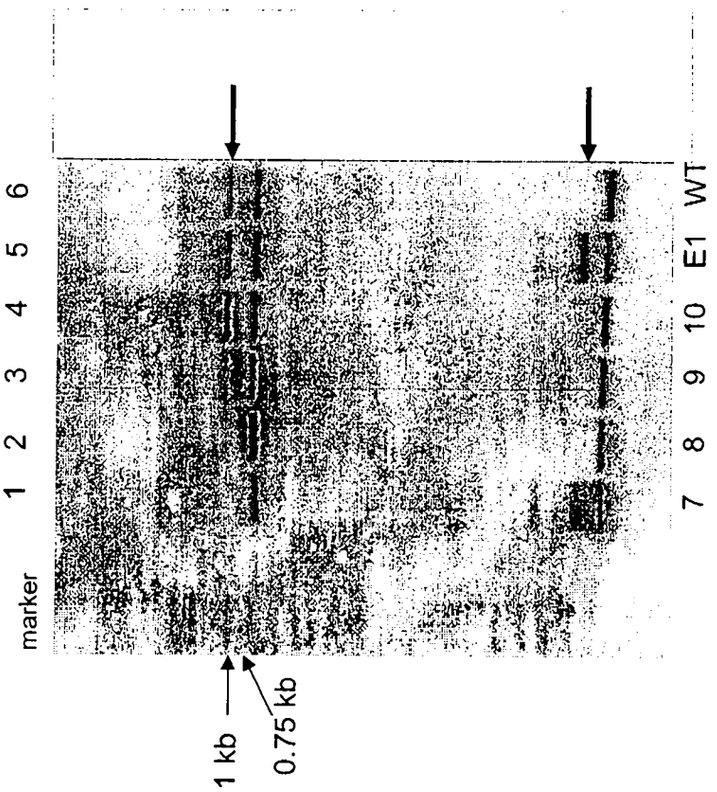


Figure 17

Chlorella protothecoides codon usage table

Phe	UUU	39	(0.82)	Ser	UCU	50	(1.04)
	UUC	56	(1.18)		UCC	60	(1.25)
Leu	UUA	10	(0.20)		UCA	46	(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	63	(1.12)		CGC	63	(1.23)
Gln	CAA	59	(0.84)		CGA	46	(0.90)
	CAG	82	(1.16)		CGG	47	(0.92)
Ile	AUU	24	(0.69)	Thr	ACU	32	(0.67)
	AUC	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	43	(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)

Figure 18

A. Dunaliella salina most preferred codons
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)

B. Chlorella pyrenoidosa most preferred codons
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)

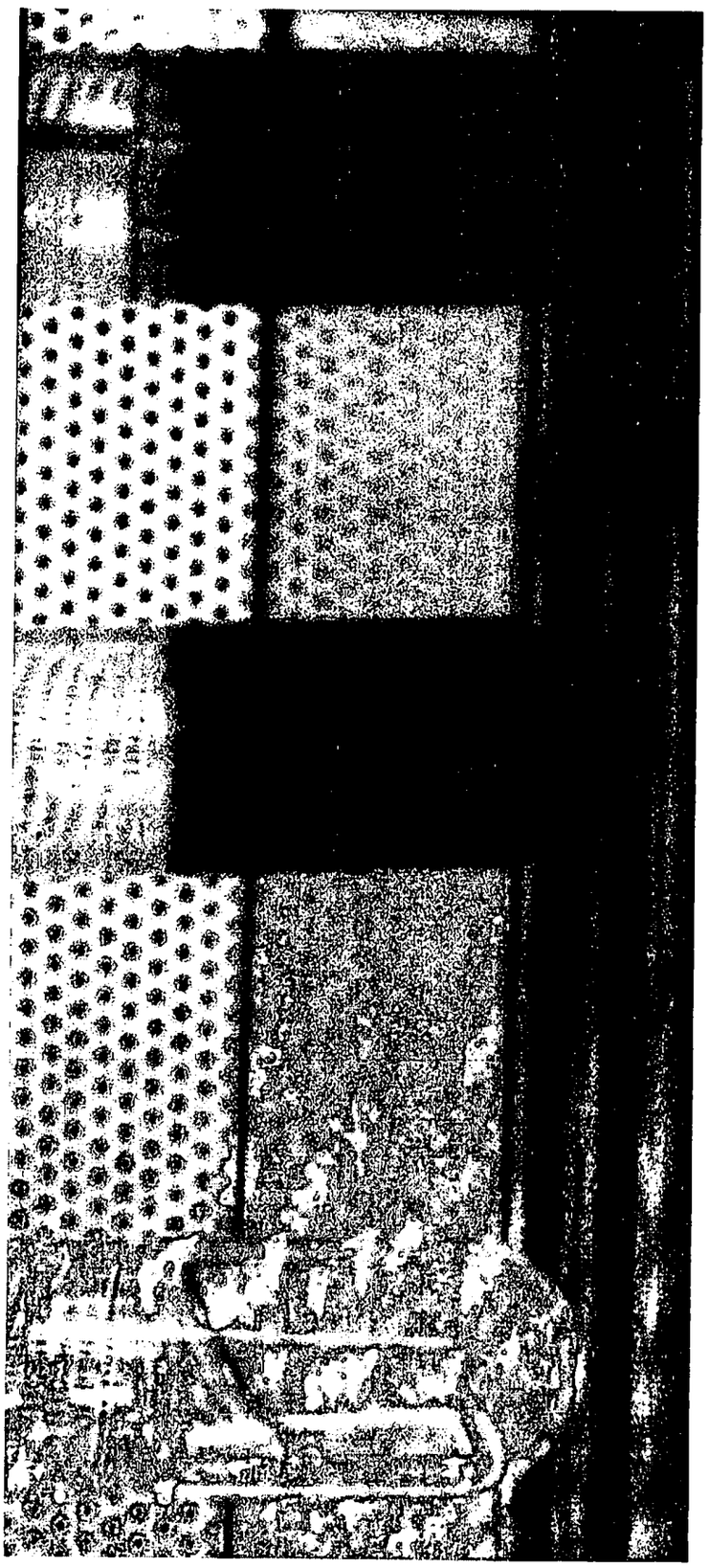


Figure 19

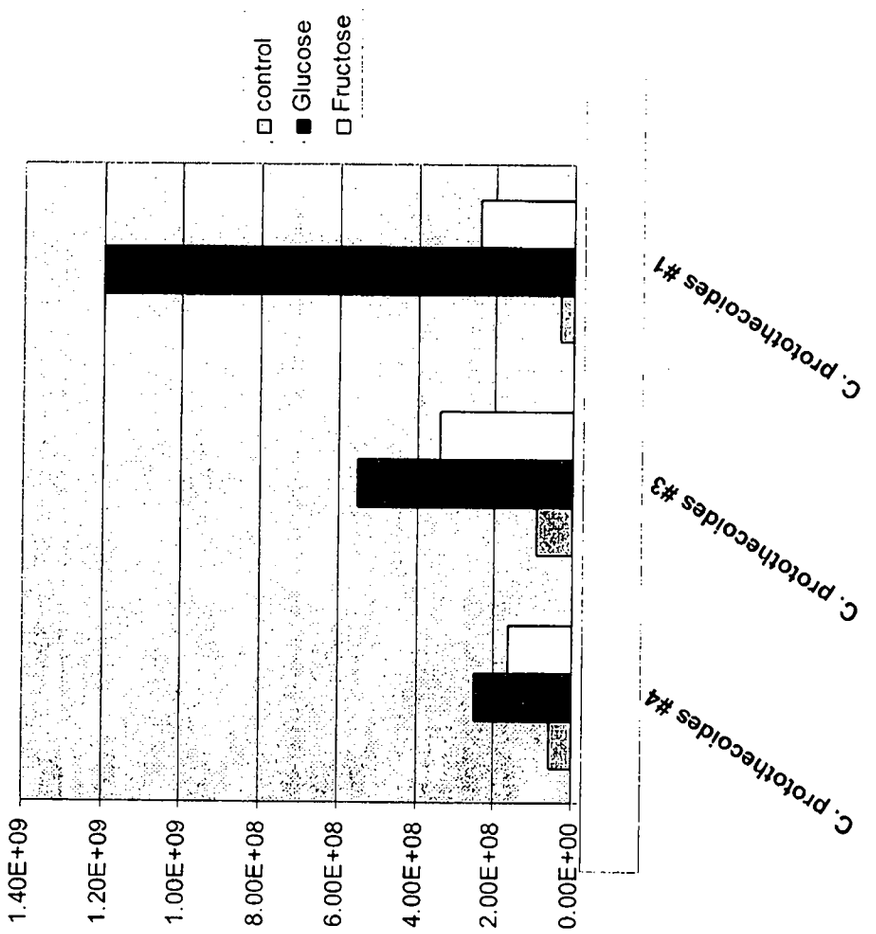

control
Glucose
Fructose
1.40E+09
1.20E+09
1.00E+09
8.00E+08
6.00E+08
4.00E+08
2.00E+08
0.00E+00
Cell density (cells/ml)
C. protothecoides #4
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1

Figure 20

Chlorella fusca (a)
cells/ml
2.00E+06
1.80E+06
1.60E+06
1.40E+06
1.20E+06
1.00E+06
8.00E+05
6.00E+05
4.00E+05
2.00E+05
0.00E+00
Initial
Proteose Ctrl
Proteose + 1% Sucrose

Chlorella fusca (b)
cells/ml
7.00E+07
6.00E+07
5.00E+07
4.00E+07
3.00E+07
2.00E+07
1.00E+07
0.00E+00
Initial
Proteose Ctrl
Proteose + 1% Sucrose

Figure 21

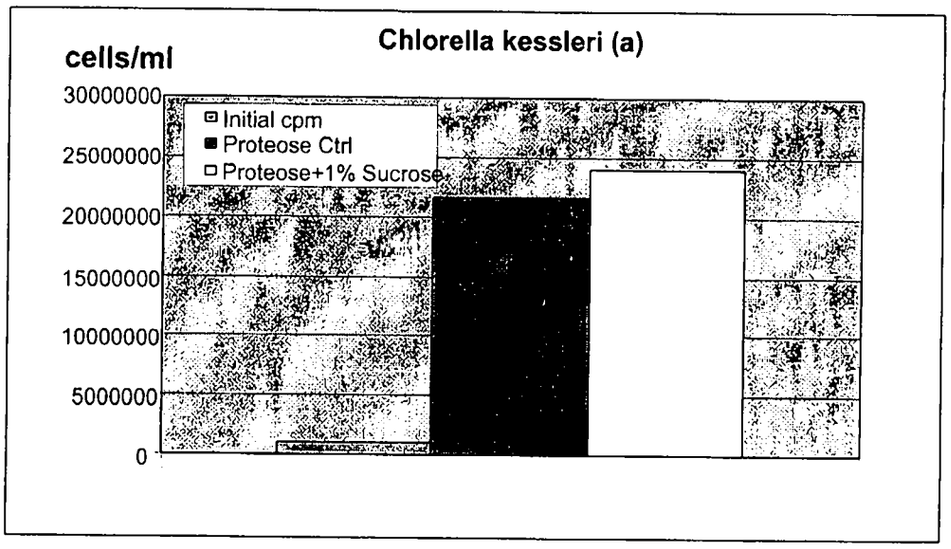
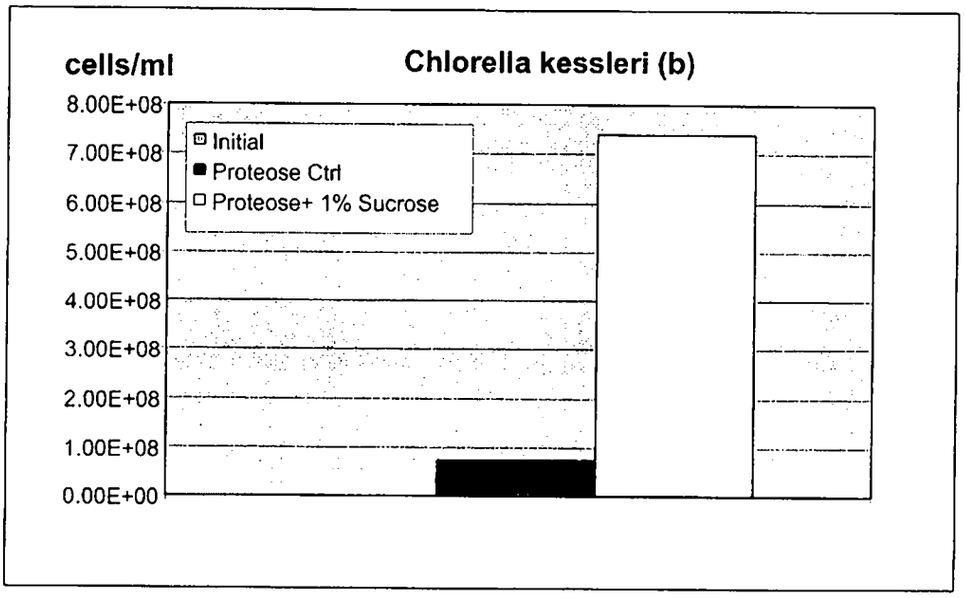


Figure 22



122

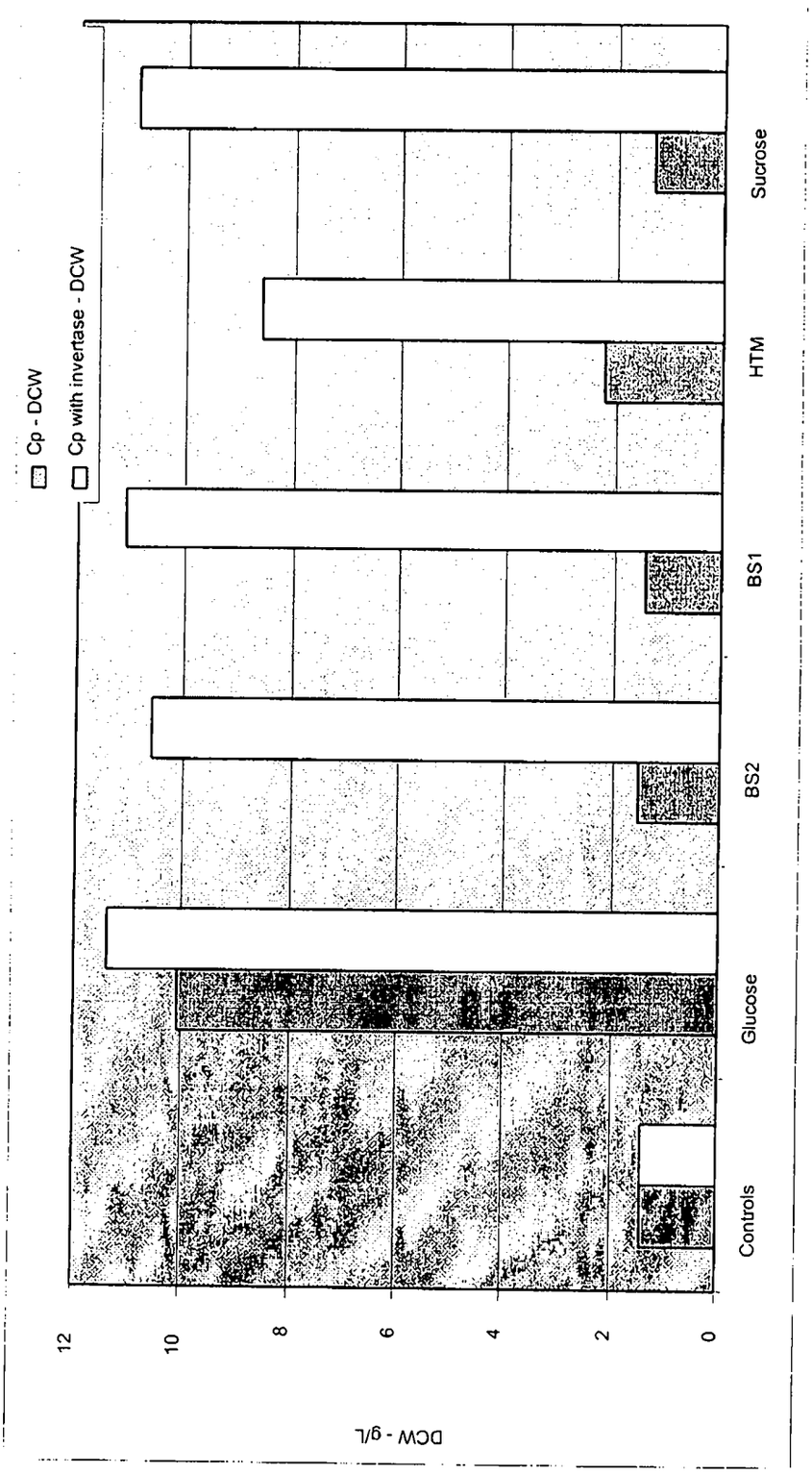
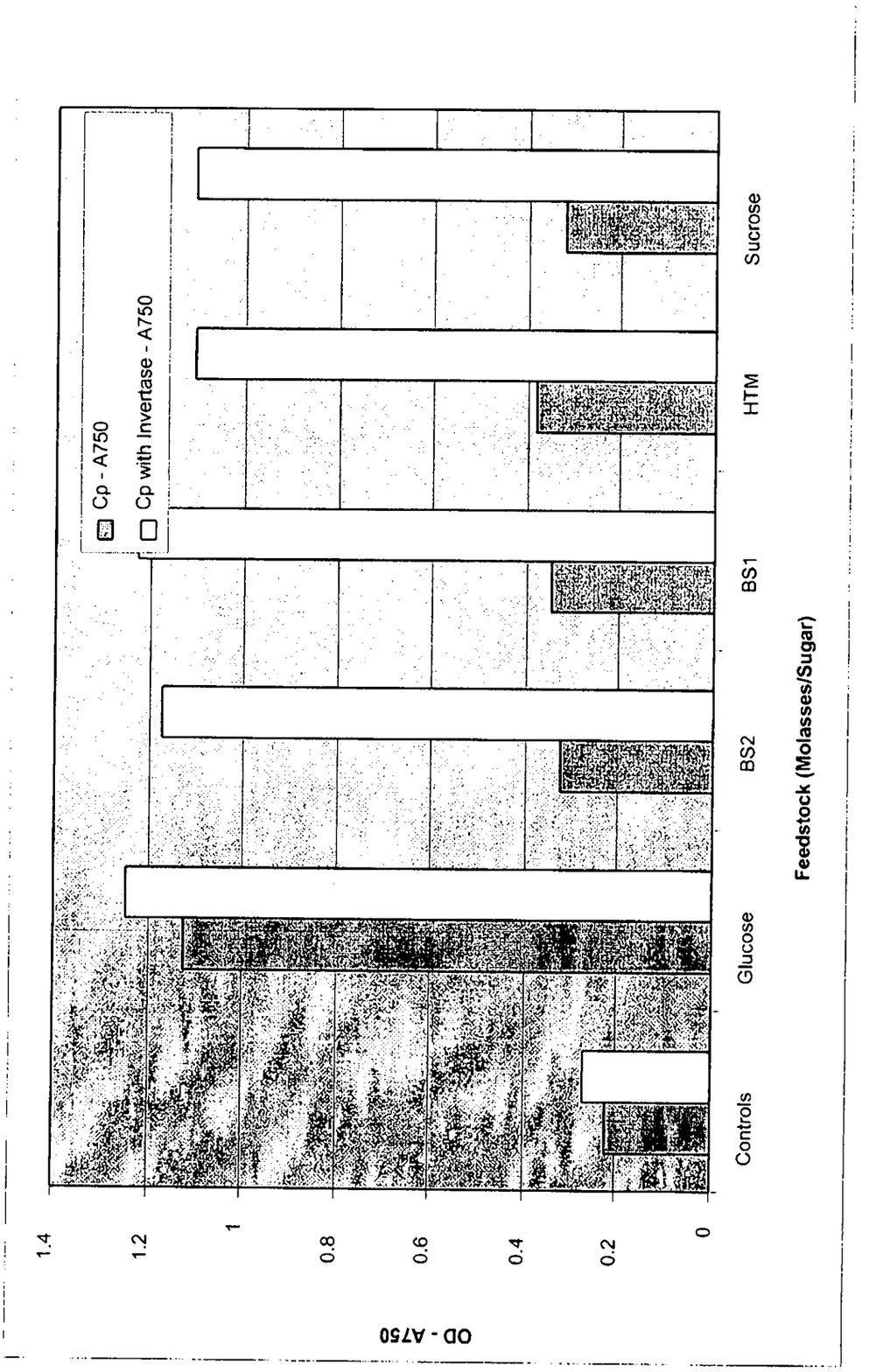

Cp - DCW
Cp with invertase - DCW
DCW - g/L
0
2
4
6
8
10
12
Controls
Glucose
BS2
BS1
HTM
Sucrose
Feedstock (Molasses/Sugar)

Figure 23

Figure 24


Cp - A750
Cp with Invertase - A750
OD - A750
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
Controls
Glucose
BS2
BS1
HTM
Sucrose
Feedstock (Molasses/Sugar)

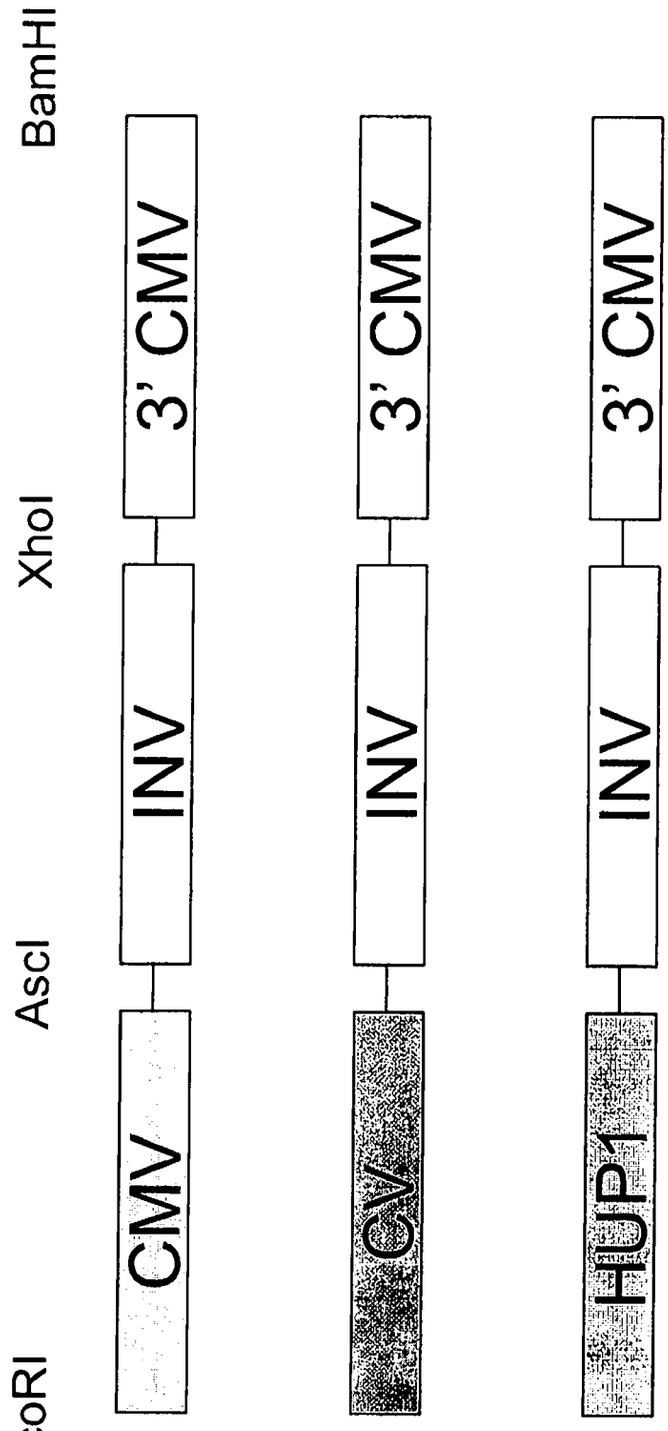


Figure 25

235

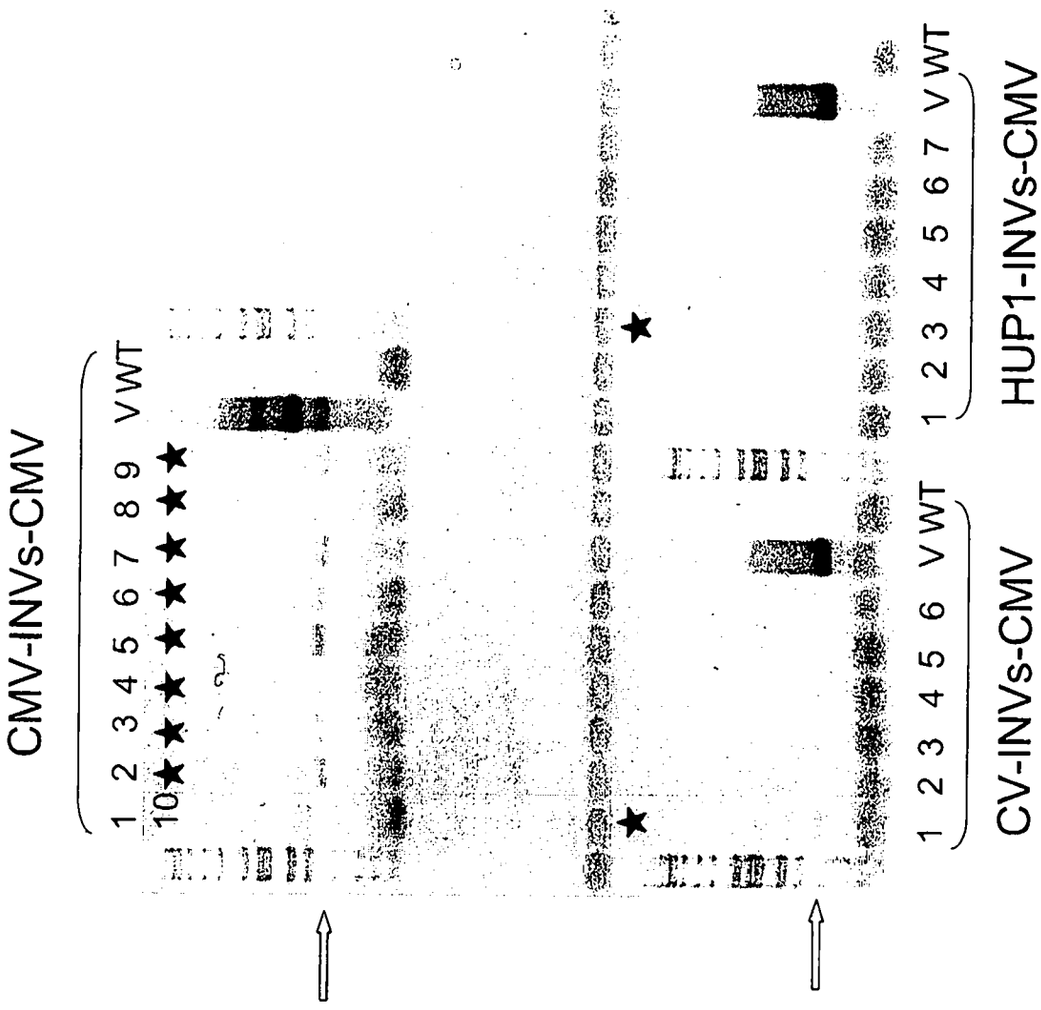
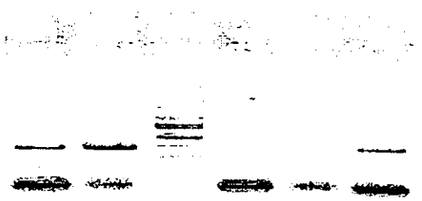


Figure 26

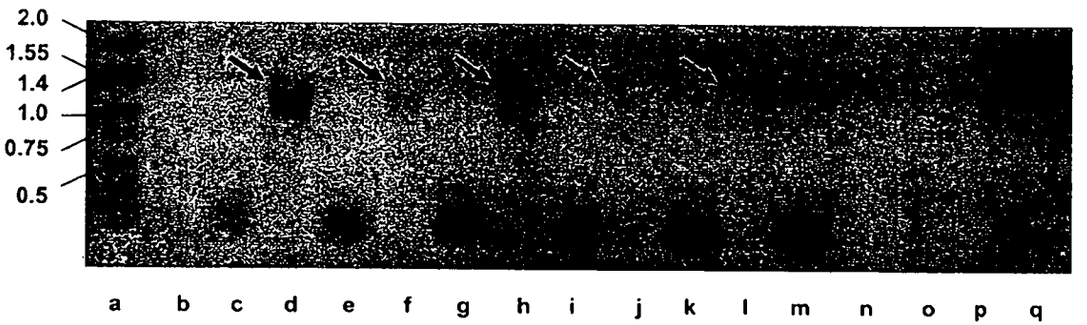
Figure 27



a b c d e

a -Plasmid (200 pg/ uL)
b -Plasmid (200 ng/ uL)
c –Wild type DNA
d -Transformant #1
e -Transformant #2

Figure 28



a. DNA size standards in kilo base pairs
b. Primer set 2 control (no template)
c. Primer set 4 control (no template)
d. 1 picogram of plasmid control, primer set 2
e. 1 picogram of plasmid control, primer set 4
f. Chlorella minutissima transformant #1, primer set 2
g. Chlorella minutissima transformant #1, primer set 4
h. Chlorella minutissima transformant #2, primer set 2
i. Chlorella minutissima transformant #2, primer set 4
j. Chlorella emersonii transformant #1, primer set 2
k. Chlorella emersonii transformant #1, primer set 4
l. Chlorella emersonii transformant #2, primer set 2
m. Chlorella emersonii transformant #2, primer set 4
n. wild type Chlorella minutissima, primer set 2
o. wild type Chlorella minutissima, primer set 4
p. wild type Chlorella emersonii, primer set 2
q. wild type Chlorella emersonii, primer set 4

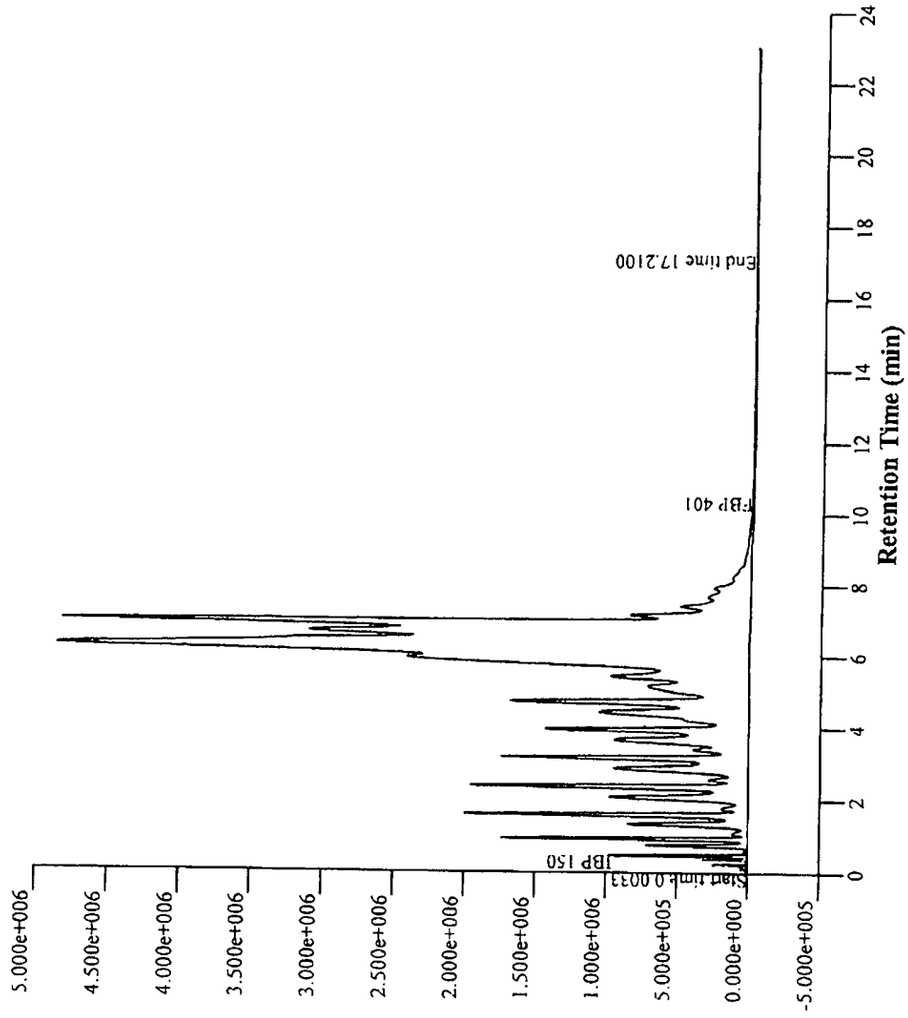

5.000e+006
4.500e+006
4.000e+006
3.500e+006
3.000e+006
2.500e+006
2.000e+006
1.500e+006
1.000e+006
5.000e+005
0.000e+000
-5.000e+005
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Retention Time (min)
JBP 150
Start time 0.0033
FBP 401
End time 17.2100

Figure 29

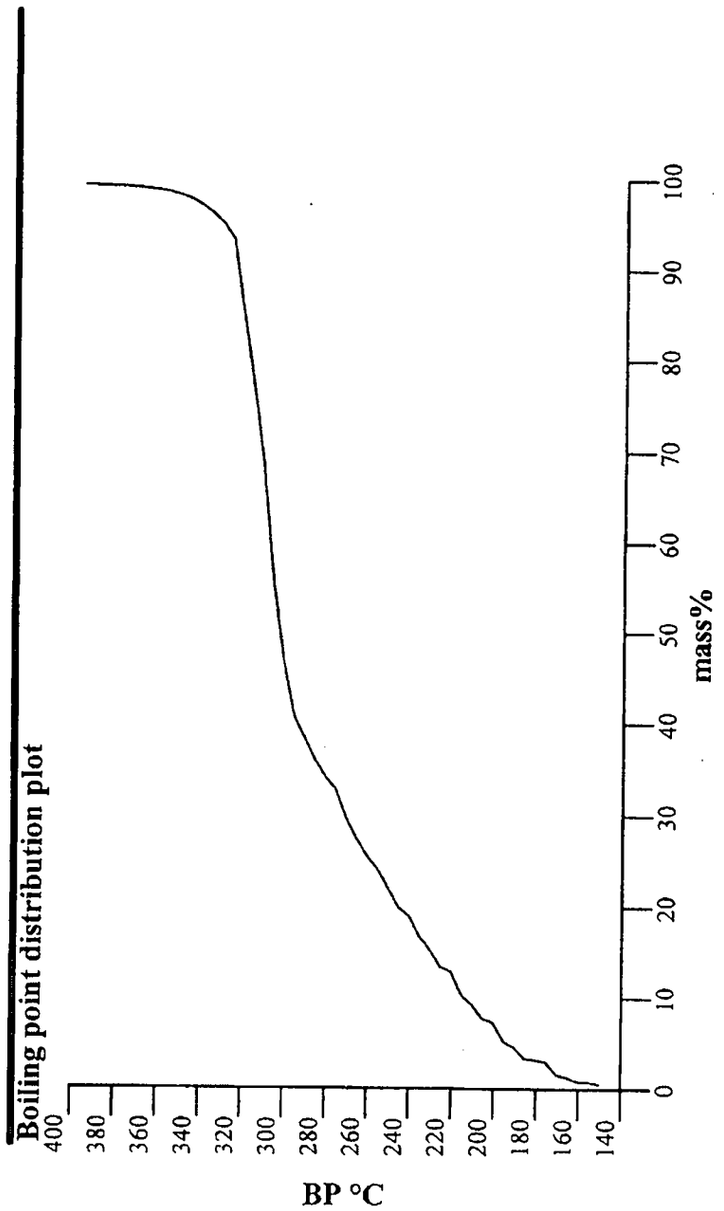

Boiling point distribution plot
400
380
360
340
320
300
280
260
240
220
200
180
160
140
BP °C
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
mass%

Figure 30

PRODUCCIÓN DE ACEITE EN 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*,

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*, *Mortierla 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

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 catáliza 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

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

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. Crecimiento Fotosintético

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 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ (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. Cultivo heterotrófico

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

09-149183
(Parte 4)
328

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(1):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(1 1):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(1-3):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 1;300(1):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

prototheocoides 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 célulares 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

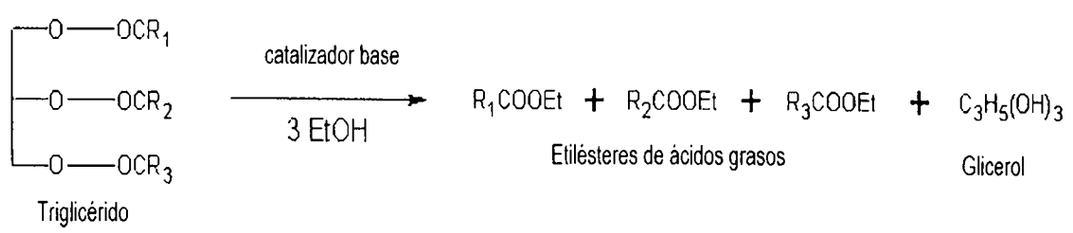
pueden también ser usados en el método para producir biodiesel.

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-111/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(1):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(1):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; 1(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(1):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(1):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(1):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(1):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(1): 187-94; Plant Mol

Biol. 1994 Oct; 26(1):85-93; Virology. 2004 Ago 15; 326(1):150-9; y Virology. 2004 Ene 5; 318(1):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. **Expresión Inducible**

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. Expresión por Compartimientos

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(1):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 1 : 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/Ml. Las células fueron recuperadas y lavadas mediante centrifugación por 5 minutos a 1600 g y resuspendidas en 5 Ml 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 5×10^5 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, NaNO3 2.94mM, CaCl2•2H2O 0.17mM, MgSO4•7H2O 0.3mM, K2HPO4 0.4mM, KH2PO4 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, $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ 0.8mM, $CaCl_2 \bullet 2H_2O$ 0.25mM, Na_2EDTA 2mM, $FeCl_3 \bullet 6H_2O$ 0.36mM, $MnCl_2 \bullet 4H_2O$ 0.21mM, $ZnCl_2$ 0.037mM, $CoCl_2 \bullet 6H_2O$ 0.0085mM, $NaMoO_4 \bullet 2H_2O$ 0.017, $CuSO_4 \bullet 5H_2O$ 0.78µM, $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$ 0.15µM, H_3BO_3 10µM y vitamina B_{12} 0.001mM. El medio de extracto de suelo consiste de $NaNO_3$ 2.94Mm, $CaCl_2 \bullet 2H_2O$ 0.17mM, $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ 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 $CaCl_2 \bullet 2H_2O$, 0.075g de $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ 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 5×10^5 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 BS1, 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% BS1 ; (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 HUP1 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, AscI/XhoI, 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 BsaI 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 HUP1: 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
cgccggcagcgttcatgtccgggcccagggcagcggtggtgccataaatgtcggtgatggtggggagggggccgtcgccacacc
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
ccggaagccccctggcccacaaaggctaggcgccaatgcaagcagttcgcatgcagcccctggagcggtgccctcctgataaacc
ggccaggggcctatgttctttacttttttacaagagaagtcactcaacatcttaaacggtcttaagaagtctatccgg

SEQ ID NO:5

CMV-Hyg-CMV BamHI-SacII cassette de pCAMBIA:

ggatccccgggaattcggcgcgccgggcccaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctca
gaagaccaaagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatca
aaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgaca
gtggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgat
gtgataacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgagacttttc
aacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaaggtgg
cacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccaccc
acgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatg

acgcacaatcccactatccttcgcaagaccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctgaaatcaccagtctctct
ctacaaatctatctctctcgagctttcgcagatcccgggggcaatgagatatgaaaaagcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaa
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

MANKLLLLLLLLLPLAASG

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
agacccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctgaaatcaccagtctctctctacaaatctatctctggcgcgcc
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

1. Un método para producir diesel renovable, caracterizado porque comprende:

(a) cultivar una población de microorganismos en presencia de una fuente fija de carbono, en donde:

(i) los microorganismos acumulan por lo menos 10% de su peso seco de células como lípidos y

(ii) la fuente fija de carbono es seleccionada del grupo que consiste de glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarosa, melazas, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, fructosa, arabinosa, manosa, acetato y cualquier combinación de las anteriores;

(b) aislar los componentes lípidos de los microorganismos cultivados y

(c) someter los componentes de lípido aislados a una o más reacciones químicas para generar alcanos de cadena recta, mediante el cual se produce el diesel renovable.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo es una microalga.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el microorganismo es una especie del

género *Chlorella*.

5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque 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 glucotropha*, *Chlorella infusionum*, *Chlorella infusionum var. Actophila*, *Chlorella infusorium 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 protothecoides*, *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 var. tertia*, *Chlorella vulgaris var. airidis*, *Chlorella vulgaris var. vulgaris*, *Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia*, *Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis*, *Chlorella cnthella* y *Chlorella zofigiensis*.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

7. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la levadura oleaginosa es 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*.

8. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo es un hongo.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el hongo es seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella*, *Mortierella vinacea*, *Mortierella alpine*, *Pythium debaryanum*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Pennilicium iilacinum*, una especie del género *Hensenulo*, una especie del género *Chaetomium*, una especie del género *Cadosporium*, una especie del gémero *Malbranchea*, una especie del género *Rhizopus* y una especie del género *Pythium*.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa

codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa o una fructocinasa.

12. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de la ruta de lípido.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la ruta de enzima de lípidos es seleccionada del grupo que consiste de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

14. Un método para producir combustible de jet, caracterizado porque comprende:

(a) cultivar una población de microorganismos en presencia de una fuente fija de carbono, en donde:

(i) los microorganismos acumulan por lo menos 10% de su peso seco de célula como lípido y

(ii) la fuente fija de carbono 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 componentes de lípidos a partir de los microorganismos cultivados y

(c) someter los componentes de lípido aislados a una o más

reacciones químicas para generar alcanos de cadena recta, mediante el cual se produce el combustible de jet.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el microorganismo es una microalga.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1.

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el microorganismo es una especie del género *Chlorella*.

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque 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 glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. Actophila, Chlorella infusorium 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 protothecoides, 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 var. tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella cnthella y *Chlorella zofigiensis.*

19. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

20. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la levadura oleaginosa es 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.*

21. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el microorganismo es un hongo.

22. El método de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el hongo es seleccionado a partir del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella, Mortierella vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus*

terreus, *Pennilicium iilacinum*, una especie del género *Hensenulo*, una especie del género *Chaetomium*, una especie del género *Cadosporium*, una especie del gémero *Malbranchea*, una especie del género *Rhizopus* y una especie del género *Pythium*.

23. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa o una fructocinasa.

25. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de la ruta de lípidos.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la enzima de la ruta de lípido es seleccionada a partir del grupo que consiste de estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

27. Una composición de hidrocarburos líquidos, caracterizada porque es elaborada de acuerdo con el método de la reivindicación 1, en donde la composición se conforma a las especificaciones de ASTM D975.

28. La composición de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque el microorganismo es una microalga.

29. La composición de conformidad con la reivindicación 28, caracterizada porque el microorganismo es seleccionado a partir del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1.

30. La composición de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque el microorganismo es una especia del género *Chlorella*.

31. La composición de conformidad con la reivindicación 30, caracterizada porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de *Chlorella anitrata, Chlorella antartica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella dessicata, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. Vacuolata, Chlorella glucorotropha, Chlorella infosium, Chlorella infosium var actophila, Chlorella infosium var auxeophila, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var aureoviridis, Chlorella luteoviridis var lutescens, Chlorellaminiata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella regularis, Chlorella regularis var minima, Chlorella regularis var umbricata, Chlorella reisiglii,*

Chlorella saccharophila, Chlorella saccharofila var ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vannielli, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris var tertia, Chlorella vulgaris var airidis, Chlorellavulgaris var vulgaris, Chlorella vulgaris var vulgarias f. tertia, Chlorella vulgarias var vulgarias f. viridis, Chlorella xanthella y Chlorella zofingiensis.

32. La composición de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

33. La composición de conformidad con la reivindicación 32, caracterizada porque la levadura oleaginosa es seleccionada del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomyces vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis* y *Yarrowia lipolytica.*

34. La composición de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque el microorganismo es un hongo.

35. La composición de conformidad con la reivindicación 34, caracterizada porque el hongo es seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella, Mortierella vinacea, Mortierella alpine, Pythium*

debaryanum, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Pennicilium iilacinum*, una especie del género *Hansenulo*, 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*.

36. La composición de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque el microorganismo contiene por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

37. La composición de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa o una fructocinasa.

38. La composición de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque el microorganismo contiene por lo menos un gen exógeno que codifica a una enzima de ruta de lípido.

39. La composición de conformidad con la reivindicación 38, caracterizada porque la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una priruvato deshidrogenasa, acil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3-fosfato aciltransferasa.

40. una composición de hidrocarburos líquidos caracterizada porque es producida de acuerdo con el método de la reivindicación 14, en donde la composición se conforma a las especificaciones de D1655 de ASTM.

41. La composición de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque el microorganismo es una microalga.

42. La composición de conformidad con la reivindicación 41, caracterizada porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la tabla 1.

43. La composición de conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque el microorganismo es una especie del género *Chlorella*.

44. La composición de conformidad con la reivindicación 43, caracterizada porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de *Chlorella anitrata, Chlorella antartica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella dessicata, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. Vacuolata, Chlorella glucorotropha, Chlorella infosium, Chlorella infosium var actophila, Chlorella infosium var auxeophila, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var aureoviridis, Chlorella luteoviridis var lutescens, Chlorellaminiata, Chlorella minutissima,*

Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella regularis, Chlorella regularis var minima, Chlorella regularis var umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharofila var ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vannielli, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris var tertia, Chlorella vulgaris var airidis, Chlorellavulgaris var vulgaris, Chlorella vulgaris var vulgarias f. tertia, Chlorella vulgarias var vulgarias f. viridis, Chlorella xanthella y Chlorella zofingiensis.

45. La composición de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

46. La composición de conformidad con la reivindicación 45, caracterizada porque la levadura oleaginosa es seleccionada del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomyces vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis* y *Yarrowia lipolytica.*

47. La composición de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque el microorganismo es un hongo.

48. La composición de conformidad con la reivindicación 47, caracterizada porque el hongo es seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella, Mortierella vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicilium iilacinum*, una especie del género *Hansenulo*, 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*.

49. La composición de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque el microorganismo contiene por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

50. La composición de conformidad con la reivindicación 49, caracterizada porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa o una fructocinasa.

51. La composición de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque el microorganismo contiene por lo menos un gen exógeno que codifica a una enzima de ruta de lípido.

52. La composición de conformidad con la reivindicación 51, caracterizada porque la enzima de ruta de

lípido es seleccionada del grupo que consiste de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una priruvato deshidrogenasa, acil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3-fosfato aciltransferasa.

53. una microalga o células de levadura caracterizada porque ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de la ruta de lípido a un nivel alterado en comparación con una célula tipo silvestre de la misma especia.

54. La célula de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque la célula produce más lípido en comparación con la célula tipo silvestre cuando ambas células son cultivadas bajo las mismas condiciones.

55. La célula de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque la célula ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de ruta de lípido a un nivel más alto que las células tipo silvestre.

56. La célula de conformidad con la reivindicación 55, caracterizada porque la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de piruvato deshidrogenasa, acil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3-fosfato aciltransferasa.

57. La célula de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque la célula ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de ruta de lípido a un nivel más bajo que las células tipo silvestre.

58. La célula de conformidad con la reivindicación 57, caracterizada porque la enzima de ruta de lípido comprende citrato cintasa.

59. La célula de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque la célula ha sido diseñada genéticamente y/o seleccionada para expresar un regulador global de síntesis de ácido graso a un nivel más alterado en comparación con la célula tipo silvestre, mediante lo cual los niveles de expresión de una prioridad de genes sintéticos de acido graso son alterados en comparación con la célula tipo silvestre.

60. La célula de conformidad con la reivindicación 57, caracterizada porque la enzima de ruta de lípido comprende una enzima que modifica un acido graso.

61. La célula de conformidad con la reivindicación 60, caracterizada porque la enzima de ruta de lípido es seleccionada de estearoil-ACP desaturasa y una glicerolípido desaturasa.

62. La célula de conformidad con la reivindicación 53, caracterizada porque la célula es una especie de microalga seleccionada de la tabla 1.

63. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 62, caracterizada porque la microalga es del género *Chlorella*.

64. La microalga de de conformidad con la

reivindicación 63, caracterizada porque la microalga es de la especie seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella anitrata, Chlorella antartica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella dessicata, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. Vacuolata, Chlorella glucorotropha, Chlorella infosium, Chlorella infosium var actophila, Chlorella infosium var auxeophila, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var aureoviridis, Chlorella luteoviridis var lutescens, Chlorellaminiata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella regularis, Chlorella regularis var minima, Chlorella regularis var umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharofila var ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vannielli, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris var tertia, Chlorella vulgaris var airidis, Chlorellavulgaris var vulgaris, Chlorella vulgaris var vulgarias f. tertia, Chlorella vulgarias var vulgarias f. viridis, Chlorella xanthella y Chlorella zofingiensis.*

65. un microbio productor de aceite que contiene una o más genes exógenos caracterizados, porque los genes exógenos

codifican proteínas seleccionadas del grupo que consiste de una acil-ACP tioesterasa grasa, acil-CoA reductasa grasa, una aldehído reductasa grasa, una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, una aldehído descarbonilasa grasa y una proteína portadora de acilo.

66. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizada porque el microbio es una microalga.

67. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

68. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizada porque la levadura oleaginosa es seleccionada del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomyces vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis* y *Yarrowia lipolytica*.

69. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizada porque el microorganismo es un hongo.

70. El microbio de conformidad con la reivindicación 69, caracterizada porque el hongo es seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella, Mortierella vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicilium iilacinum*, una especie del género *Hansenulo*, 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*.

71. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizada porque el microbio es seleccionado del grupo que consiste de los microorganismos enlistados en la tabla 1.

72. El microbio de conformidad con la reivindicación 71, caracterizada porque el microbio es una especia del género *Chlorella*.

73. El microbio de conformidad con la reivindicación 72, caracterizada porque la microalga es de la especie seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella anitrata*, *Chlorella antartica*, *Chlorella aureoviridis*, *Chlorella candida*, *Chlorella capsulata*, *Chlorella dessicata*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella fusca*, *Chlorella fusca var. Vacuolata*, *Chlorella glucorotropha*, *Chlorella infosium*, *Chlorella infosium var actophila*, *Chlorella infosium var auxeophila*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella luteoviridis*, *Chlorella luteoviridis var aureoviridis*, *Chlorella luteoviridis var lutescens*, *Chlorellaminiata*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella mutabilis*, *Chlorella nocturna*, *Chlorella parva*, *Chlorella photophila*, *Chlorella pringsheimii*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella regularis*, *Chlorella regularis var minima*, *Chlorella regularis var umbricata*, *Chlorella reisiglii*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella saccharofila var ellipsoidea*, *Chlorella salina*, *Chlorella simplex*, *Chlorella*

sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vannielli, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris var tertia, Chlorella vulgaris var airidis, Chlorellavulgaris var vulgaris, Chlorella vulgaris var vulgarias f. tertia, Chlorella vulgarias var vulgarias f. viridis, Chlorella xanthella y Chlorella zofingiensis.

74. El microbio de conformidad con la reivindicación 73, caracterizada porque la especie seleccionada es *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea o Chlorella sp.*

75. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizada el gen exógeno está en enlace operable con un promotor, que es inducible o represible en respuesta a un estímulo.

76. El microbio de conformidad con la reivindicación 75, caracterizada porque el estimulo es seleccionado del grupo que consiste de una molécula pequeña provista exógenamente, calor, frío y luz.

77. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizada porque el gen exógeno es expresado en un compartimento celular.

78. El microbio de conformidad con la reivindicación 77, caracterizada porque el compartimento celular es seleccionado del grupo que consiste de un cloroplasto y una

mitocondria.

79. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizada porque el gen exógeno codifica a una acil-ACP tioesterasa de ácido graso.

80. El microbio de conformidad con la reivindicación 79, caracterizada porque la tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza le escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de una proteína portadora de acilo (ACP).

81. El microbio de conformidad con la reivindicación 80, caracterizada porque la tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 átomos de carbono de una ACP.

82. El microbio de conformidad con la reivindicación 81, caracterizada porque la tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 átomos de carbono de una ACP.

83. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizada porque el gen exógeno codifica a una acil-CoA/aldehído reductasa grasa.

84. El microbio de conformidad con la reivindicación 83, caracterizada porque la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA grasa de 20 a 30 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente.

85. El microbio de conformidad con la reivindicación 83, caracterizada porque la reductasa codificada por el gen

exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA grasa de 8 a 18 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente.

86. El microbio de conformidad con la reivindicación 85, caracterizada porque la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA grasa de 10 a 14 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente.

87. El microbio de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA grasa de 12 átomos de carbono a un dodecanol.

88. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa.

89. El microbio de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado porque la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA grasa de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente.

90. El microbio de conformidad con la reivindicación 89, caracterizado porque la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA grasa de 12 átomos de carbono a dodecanal.

91. El microbio de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el microbio contiene además uno o más genes de utilización de sacarosa exógenos.

92. un microbio que contiene dos genes exógenos,

caracterizado porque 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.

93. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque el microbio es una microalga.

94. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

95. El microbio de conformidad con la reivindicación 94, caracterizada porque la levadura oleaginosa es seleccionada del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomyces vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis* y *Yarrowia lipolytica*.

96. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizada porque el microorganismo es un hongo.

97. El microbio de conformidad con la reivindicación 96, caracterizada porque el hongo es seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella, Mortierella vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicilium iilacinum*, una especie del género *Hansenulo*, 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*.

98. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizada porque el microbio es seleccionado del grupo que consiste de los microorganismos enlistados en la tabla 1.

99. El microbio de conformidad con la reivindicación 98, caracterizada porque el microbio es una especia del género *Chlorella*.

100. El microbio de conformidad con la reivindicación 99, caracterizada porque la microalga es de la especie seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella anitrata*, *Chlorella antartica*, *Chlorella aureoviridis*, *Chlorella candida*, *Chlorella capsulata*, *Chlorella dessicata*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella fusca*, *Chlorella fusca var. Vacuolata*, *Chlorella glucorotropha*, *Chlorella infosium*, *Chlorella infosium var actophila*, *Chlorella infosium var auxeophila*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella luteoviridis*, *Chlorella luteoviridis var aureoviridis*, *Chlorella luteoviridis var lutescens*, *Chlorellaminiata*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella mutabilis*, *Chlorella nocturna*, *Chlorella parva*, *Chlorella photophila*, *Chlorella pringsheimii*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella regularis*, *Chlorella regularis var minima*, *Chlorella regularis var umbricata*, *Chlorella reisiglii*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella saccharofila var ellipsoidea*, *Chlorella salina*, *Chlorella simplex*, *Chlorella*

sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vannielli, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris var tertia, Chlorella vulgaris var airidis, Chlorellavulgaris var vulgaris, Chlorella vulgaris var vulgarias f. tertia, Chlorella vulgarias var vulgarias f. viridis, Chlorella xanthella y Chlorella zofingiensis.

101. El microbio de conformidad con la reivindicación 100, caracterizada porque la especie seleccionada es *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea o Chlorella sp.*

102. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizada porque cada uno de los dos genes exógenos están en enlace operable con un promotor, que es inducible en respuesta a un estímulo.

103. El microbio de conformidad con la reivindicación 102, caracterizado porque cada promotor es inducible en respuesta a un estímulo idéntico.

104. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque 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.

105. El microbio de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque el segundo gen exógeno codificada una acil-CoA/aldehpido reductasa grasa que cataliza la reducción de

un acil-CoA graso de 8 a 18 átomos de carbono a un alcohol primario correspondiente.

106. El microbio de conformidad con la reivindicación 105, caracterizado porque la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 átomos de carbono de una ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA grasa 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 carbonos.

107. El microbio de conformidad con la reivindicación 106, caracterizado porque la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 átomos de carbono de una ACP y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA grasa de 12 átomos de carbono a dodecanol.

108. El microbio de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque el segundo gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa que cataliza la reducción de una acil-CoA grasa de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiente.

109. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque el segundo gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa y el microbio contiene además un tercer gen exógeno que codifica una aldehído descarbonilasa

grasa.

110. El microbio de conformidad con la reivindicación 109, caracterizado porque la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de una ACP, la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA grasa 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 descarbonilasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbonos.

111. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque el microbio contiene además uno o más genes de utilización de sacarosa exógenos.

112. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque el segundo gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co- expresada naturalmente con al acil-ACP tioesterasa grasa.

113. El microbio de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque 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.

114. El microbio de conformidad con la reivindicación 113, caracterizado porque el tercer gen exógeno codifica una acil-CoA reductasa grasa y el microbio contiene además un cuarto gen exógeno que codifica una aldehído desacarbonilasa grasa.

115. Un método para producir una molécula en una población de microbios, el método comprende cultivar una población de microbios en un medio de cultivo, caracterizado porque 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

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

116. El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque el microbio es una microalga.

117. El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

118. El método de conformidad con la reivindicación

117, caracterizado porque la levadura oleaginosa es seleccionada del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus terricolus*, *Candida sp.*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer*, *Endomyces vernalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis* y *Yarrowia lipolytica*.

119. El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque el microorganismo es un hongo.

120. El método de conformidad con la reivindicación 119, caracterizado porque el hongo es seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella*, *Mortierella vinacea*, *Mortierella alpine*, *Pythium debaryanum*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Pennicilium iilacinum*, una especie del género *Hansenulo*, 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*.

121. El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque el microbio es seleccionado del grupo que consiste de los microorganismos enlistados en la tabla 1.

122. El método de conformidad con la reivindicación 121, caracterizado porque el microbio es una especia del género *Chlorella*.

123. El método de conformidad con la reivindicación 122, caracterizado porque la especie seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella anitrata*, *Chlorella antartica*, *Chlorella*

aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulata, Chlorella dessicata, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. Vacuolata, Chlorella glucorotropha, Chlorella infosium, Chlorella infosium var actophila, Chlorella infosium var auxeophila, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var aureoviridis, Chlorella luteoviridis var lutescens, Chlorellaminiata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella regularis, Chlorella regularis var minima, Chlorella regularis var umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharofila var ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vannielli, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris var tertia, Chlorella vulgaris var airidis, Chlorellavulgaris var vulgaris, Chlorella vulgaris var vulgarias f. tertia, Chlorella vulgarias var vulgarias f. viridis, Chlorella xanthella y Chlorella zofingiensis.

124. El método de conformidad con la reivindicación 123, caracterizado porque la especie seleccionada es *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea o Chlorella sp.*

125. El método de conformidad con la reivindicación

115, caracterizada porque el medio de cultivo contiene glicerol.

126. El método de conformidad con la reivindicación 125, caracterizada porque el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación.

127. El método de conformidad con la reivindicación 125, caracterizado porque el medio de cultivo contiene glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fija.

128. El método de conformidad con la reivindicación 127, caracterizado porque la por lo menos otra fuente de carbono fija es sacarosa.

129. El método de conformidad con la reivindicación 127, caracterizado porque 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.

130. El método de conformidad con la reivindicación 127, caracterizado porque el glicerol y por lo menos otra fuente fija de carbono son alimentados a los microbios a una velocidad predeterminada en el curso de la fermentación.

131. El método de conformidad con la reivindicación 127, caracterizado porque:

(a) el glicerol es provisto a los microbios en ausencia de la por lo menos otra fuente fija de carbono por un primer período de tiempo;

(b) la por lo menos otra fuente fija de carbono es

provista al final del primer período de tiempo y

(c) los microbios son cultivados por un segundo período de tiempo en presencia de la por lo menos otra fuente fija de carbono.

132. El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque los genes exógenos están en enlace operable sobre un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y en donde el método comprende además:

proveer el primer estímulo y

incubar la población de microbios por un primer período de tiempo en presencia del primer estímulo para producir un alcohol.

133. El método de conformidad con la reivindicación 132, caracterizado porque comprende además extraer el alcohol de la biomasa acuosa.

134. El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque 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 una acil-CoA grasa 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 carbonos.

135. El método de conformidad con la reivindicación 134, caracterizado porque 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 escisión de una acil-CoA grasa 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 carbonos.

136. El método de conformidad con la reivindicación 135, caracterizado porque 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 una acil-Coa grasa de 12 átomos de carbono a dodecanol.

137. El método de conformidad con la reivindicación 115, caracterizado porque los microbios contienen además un tercer gen exógeno que codifica una proteína portadora de acilo.

138. El método de conformidad con la reivindicación 137, caracterizado porque el tercer gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa.

139. Un método para producir una molécula de lípido en una población de microbios, el método está caracterizado porque 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, una acil-CoA grasa y la acil-CoA reductasa grasa cataliza la reducción de la acil-CoA a un aldehído.

140. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque el microbio es una microalga.

141. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque el microbio es una levadura oleaginosa.

142. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque la levadura oleaginosa es 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*.

143. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque el microbio es un hongo.

144. El método de conformidad con la reivindicación 143, caracterizado porque el hongo es seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella*, *Mortierella*

vinacea, *Mortierella alpine*, *Pythium debaryanum*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Pennilicium iilacinum*, una especie del género *Hensenulo*, una especie del género *Chaetomium*, una especie del género *Cadosporium*, una especie del gémero *Malbranchea*, una especie del género *Rhizopus* y una especie del género *Pythium*.

145. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque el microbio es seleccionado del grupo que consiste de los microorganismos enlistados en la tabla 1.

146. El método de conformidad con la reivindicación 145, caracterizado porque el microbio es una especie del género *Chlorella*.

147. El método de conformidad con la reivindicación 146, caracterizado porque la especie es seleccionada 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 glucotropha*, *Chlorella infusionum*, *Chlorella infusionum var. Actophila*, *Chlorella infusorium 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*

protothecoides, 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 var. tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella cnthella y *Chlorella zofigiensis.*

148. El método de conformidad con la reivindicación 147, caracterizado porque la especie es *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.* o *Chlorella protothecoides.*

149. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque los genes exógenos están en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y en donde 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.

150. El método de conformidad con la reivindicación 149, caracterizado porque comprende además extraer el aldehído

de biomasa acuosa.

151. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque 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 una acil-Coa grasa a un aldehído correspondiente, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbonos.

152. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque los microbios contienen además n tercer gen exógeno que codifica una aldehído descarbonilasa grasa que cataliza la conversión del aldehído a un alcano.

153. El método de conformidad con la reivindicación 152, caracterizado porque los genes exógenos están en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y en donde el método comprende además:

proveer el primer estímulo y

incubar la población de microbios por un primer período de tiempo en presencia del primer estímulo para producir un alcano.

154. El método de conformidad con la reivindicación 153, caracterizado porque comprende además extraer el alcano de biomasa acuosa.

155. El método de conformidad con la reivindicación

152, caracterizado porque 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, la reductasa codificada por el segundo gen exógeno catalizan la reducción de una acil-CoA grasa de 8 a 18 átomos de carbono a un aldehído correspondiene 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 carbonos.

156. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque los microbios contienen además un tercer gen exógeno que codifica una proteína portadora de acilo.

157. El método de conformidad con la reivindicación 156, caracterizado porque el tercer gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa.

158. El método de conformidad con la reivindicación 156, caracterizado porque los microbios contienen además un cuarto gen exógeno que codifica una aldehído descarbonilasa grasa que cataliza la conversión del aldehído a un alcano.

159. El método de conformidad con la reivindicación 139, caracterizado porque el medio de cultivo contiene glicerol.

160. El método de conformidad con la reivindicación 159, caracterizado porque el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación.

161. El método de conformidad con la reivindicación 159, caracterizado porque el medio de cultivo contiene glicerol y por lo menos otra fuente fija de carbono.

162. El método de conformidad con la reivindicación 161, caracterizado porque la por lo menos otra fuente fija es sacarosa.

163. El método de conformidad con la reivindicación 161, caracterizado porque todo de glicerol y toda de la por lo menos otra fuente fija de carbono son provistos a los microbios al comienzo de la fermentación.

164. El método de conformidad con la reivindicación 161, caracterizado porque el glicerol y la por lo menos otra de la fuente fija de carbono son alimentados a los microbios a una velocidad predeterminada en el curso de la fermentación.

165. El método de conformidad con la reivindicación 161, caracterizado porque:

(a) el glicerol es provisto a los microbios en ausencia de por lo menos otra fuente fija de carbono por un primer período de tiempo;

(b) la por lo menos otra fuente fija de carbono es provista al final del primer período de tiempo y

(c) los microbios son cultivados por un segundo

período de tiempo en presencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija.

166. Un método para producir una molécula de ácido graso que tiene una longitud de cadena de carbonos especificada en una población de microbios, el método está caracterizado porque comprende cultivar una población de microbios que produce lípidos en un medio de cultivo, en donde los microbios contienen un gen exógeno que codifica una acil-ACP bioesterasa grasa que tiene una actividad específica a la longitud de cadena del carbono y en donde los microbios sintetizan un ácido enlazado a una proteína portadora de acilo (ACP) y la tioesterasa cataliza la escisión del ácido graso a partir de la ACP cuando el ácido graso ha sido sintetizado a la longitud de cadena de carbonos específica.

167. El método de conformidad con la reivindicación 166, caracterizado porque el microbio es una microalga.

168. El método de conformidad con la reivindicación 166, caracterizado porque el microbio es una levadura oleaginosa.

169. El método de conformidad con la reivindicación 168, caracterizado porque la levadura oleaginosa es 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*.

170. El método de conformidad con la reivindicación 166, caracterizado porque el microbio es un hongo.

171. El método de conformidad con la reivindicación 170, caracterizado porque el hongo es seleccionado del grupo que consiste de una especie del género *Mortierella*, *Mortierella vinacea*, *Mortierella alpine*, *Pythium debaryanum*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Pennilicium iilacinum*, una especie del género *Hensenulo*, una especie del género *Chaetomium*, una especie del género *Cadosporium*, una especie del gémero *Malbranchea*, una especie del género *Rhizopus* y una especie del género *Pythium*.

172. El método de conformidad con la reivindicación 170, caracterizado porque el microbio es seleccionado del grupo que consiste de los microorganismos enlistados en la Tabla 1.

173. El método de conformidad con la reivindicación 172, caracterizado porque el microbio es una especie del género *Chlorella*.

174. El método de conformidad con la reivindicación 173, caracterizado porque la especie es seleccionada 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 glucotropha*, *Chlorella infusionum*, *Chlorella infusionum var. Actophila*, *Chlorella infusorium 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 protothecoides, 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 var. tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella cnthella y *Chlorella zofigiensis*.

175. El método de conformidad con la reivindicación 174, caracterizado porque la especie es *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp.* o *Chlorella protothecoides*.

176. El método de conformidad con la reivindicación 166, caracterizado porque el gen exógeno está en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta a un primer estímulo y en donde el método comprende además:

proveer el primer estímulo e

incubar la población de microbios por un período de tiempo en presencia del primer estímulo.

177. El método de conformidad con la reivindicación 176, caracterizado porque comprende además extraer el ácido graso de la biomasa acuosa.

178. El método de conformidad con la reivindicación 166, caracterizado porque los microbios contienen además un segundo gen exógeno que codifica una proteína portadora de acilo.

179. El método de conformidad con la reivindicación 178, caracterizado porque el segundo gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo que es co-expresada naturalmente con la acil-ACP tioesterasa grasa.

180. El método de conformidad con la reivindicación 166, caracterizado porque la acil-ACP tioesterasa cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 átomos de carbono de la ACP.

181. El método de conformidad con la reivindicación 166, caracterizado porque el medio de cultivo contiene glicerol.

182. El método de conformidad con la reivindicación 181, caracterizado porque el glicerol es un producto secundario es un proceso de transesterificación.

183. El método de conformidad con la reivindicación 181, caracterizado porque el medio de cultivo contiene glicerol

y por lo menos otra fuente fija de carbono.

184. El método de conformidad con la reivindicación 183, caracterizado porque la por lo menos otra fuente de carbono es sacarosa.

185. El método de conformidad con la reivindicación 183, caracterizado porque todo del glicerol y todo de la por lo menos otra fuente fija de carbono son provistos a los microbios al comienzo de la fermentación.

186. El método de conformidad con la reivindicación 173, caracterizado porque el glicerol y la por lo menos otra fuente fija de carbono son alimentados a los microbios a una velocidad predeterminada en el curso de la fermentación.

187. El método de conformidad con la reivindicación 183, caracterizado porque:

(a) el glicerol es provisto a los microbios en ausencia de la por lo menos otra fuente fija de carbono por un primer período de tiempo;

(b) la por lo menos otra fuente fija de carbono es provista al final del primer período de tiempo y

(c) los microbios son cultivados por un segundo período de tiempo en presencia de la por lo menos otra fuente fija de carbono.

188. Una célula de microalga que contiene un gen exógeno, caracterizada porque el gen exógeno codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste de una lipasa, un

transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una fructocinasa o una enzima polisacárido no degradante.

189. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 188, caracterizada porque la célula es seleccionada de los microorganismos de la Tabla 1.

190. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 189, caracterizada porque la célula es una especie del género *Chlorella*.

191. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 190, caracterizada porque la especie es seleccionada 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 glucotropha*, *Chlorella infusionum*, *Chlorella infusionum var. Actophila*, *Chlorella infusorium 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 protothecoides*, *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 var. tertia*, *Chlorella vulgaris var. airidis*, *Chlorella vulgaris var. vulgaris*, *Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia*, *Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis*, *Chlorella cnthella* y *Chlorella zofigiensis*.

192. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 191, caracterizada porque la célula es *Chlorella minutissima*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.* o *Chlorella protothecoides*.

193. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 188, caracterizada porque el gen exógeno está en enlace operable con un promotor.

194. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 193, caracterizada porque el promotor es inducible o represible en respuesta aun estímulo.

195. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 194, caracterizada porque el estímulo es seleccionado del grupo que consiste de una molécula pequeña provista exógenamente, calor, frío y luz.

196. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 188, caracterizada porque el gen exógeno es expresado en un compartimiento celular.

197. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 196, caracterizada porque el compartimiento celular es seleccionado del grupo que consiste de un cloroplasto y una mitocondria.

198. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 188, caracterizada porque el gen codifica una lipasa que tiene por lo menos 70% de identidad de aminoácidos con una lipasa seleccioanda de la Tabla 9.

199. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 198, caracterizada porque la lipasa es novozym-435.

200. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 188, caracterizada porque el gen codifica una enzima polisacárido-degradante.

201. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 200, caracterizada porque la enzima polisacárido-degradante es endógena a un virus de *Chlorella*.

202. Una célula de microalga que contiene dos genes exógenos, caracterizada porque un primer gen exógeno codifica una lipasa y un segundo gen exógeno codifica una enzima polisacárido-degradante.

203. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 202, caracterizada porque los genes exógenos están cada uno en enlace operable con un promotor.

204. La célula de microalga de conformidad con la

reivindicación 203, caracterizada porque los genes exógenos están cada uno en enlace operable con promotores que son inducibles en respuesta a un estímulo.

205. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 204, caracterizada porque los genes exógenos están cada uno en enlace operable con promotores que son inducibles en respuesta al mismo estímulo.

206. La célula de microalga de conformidad con la reivindicación 204, caracterizada porque los genes exógenos están cada uno en enlace operable con un promotor que es inducible en respuesta por lo menos un estímulo que no induce el otro promotor.

207. Un método para la manufactura de una molécula de lípido en un microbio, el método está caracterizado porque 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 los genes exógenos están 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.

208. Un método para la manufactura de una molécula de lípido en un microbio, el método está caracterizado porque comprende:

(a) cultivar un microbio que produce lípidos durante 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 cotnacto directo con el microbio y

(c) incubar el microbio por un segundo período de tiempo para producir biomasa acuosa sometida a lisis.

209. El método de conformidad con la reivindicación 208, caracterizado porque comprende además la etapa de extraer moléculas de lípido de la biomasa acuosa sometida a lisis.

210. Una célula de microalga que contiene un gen exógeno, caracterizada porque 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.

211. Un método para cultivar un microbio que produce lípidos, el método está caracterizado porque comprende cultivar el microbio en presencia de una cantidad suficiente de uno o más co-factores para un 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.

212. El método de conformidad con la reivindicación 211, caracterizado porque el uno o más co-factores consisten de una vitamina requerida por una o más enzimas de ruta de lípido.

213. El método de conformidad con la reivindicación 211, caracterizado porque el uno o más co-factores es biotina.

214. El método de conformidad con la reivindicación 211, caracterizado porque el uno o más co-factores es/son provistos al incluir en el cultivo un microbio que ha sido diseñado genéticamente para producir el uno o más co-factores.

215. Un método para la fermentación de un microorganismo caracterizado porque comprende proveer una mezcla que comprende glucosa y xilosa como fuente de energía al microorganismo.

216. El método de conformidad con la reivindicación 215, caracterizado porque la mezcla comprende además lignina.

217. El método de conformidad con la reivindicación 215, caracterizado porque la mezcla comprende además por lo menos una especie de furfural.

218. El método de conformidad con la reivindicación 215, caracterizado porque la mezcla es material celulósico despolimerizado.

219. El método de conformidad con la reivindicación 215, caracterizado porque el microorganismo es un microalga.

220. El método de conformidad con la reivindicación

219, caracterizado porque la microalga es seleccionada de la Tabla 1.

221. El método de conformidad con la reivindicación 220, caracterizado porque la microalga es una especie del género *Chlorella*.

222. El método de conformidad con la reivindicación 221, caracterizado porque la microalga es seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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 xanthella y *Chlorella zofingiensis.*

223. El método de conformidad con la reivindicación 220, caracterizado porque la microalga es seleccionada 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.*

224. El método de conformidad con la reivindicación 215, caracterizado porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

225. El método de conformidad con la reivindicación 224, caracterizado porque la levadura oleaginosa es 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.*

226. El método de conformidad con la reivindicación 215, caracterizado porque el microorganismo es un hongo.

227. El método de conformidad con la reivindicación

226, caracterizado porque el hongo es 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*.

228. El método de conformidad con la reivindicación 215, caracterizado porque la mezcla comprende además por lo menos una enzima de utilización de sacarosa.

229. El método de conformidad con la reivindicación 228, caracterizado porque el microorganismo es del género *Chlorella*.

230. El método de conformidad con la reivindicación 215, caracterizado porque el microorganismo ha sido diseñado genéticamente para expresar un gen exógeno que codifica por lo menos una enzima de modificación de lípido, enzima de modificación de hidrocarburo o enzima de utilización de sacarosa.

231. El método de conformidad con la reivindicación 228, caracterizado porque la mezcla comprende una invertasa de sacarosa.

232. Un método para cultivar una microalga, caracterizado porque 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 acetato.

233. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque 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*.

234. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque el sustrato de carbono es xilosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de *Chlorella*, *Pseudochlorella* y *Prototheca*.

235. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque el sustrato de carbono es sacarosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de *Chlorella* y *Bracteococcus*.

236. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque el sustrato de carbono es fructosa y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de *Chlorella*, *Parachlorella*, *Prototheca* y *Scenedesmus*.

237. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque el sustrato de carbono es arabinosa y la microalga es *Chlorella sp*.

238. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque 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*.

239. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque 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*.

240. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque el sustrato de carbono es acetato y la microalga es de un género seleccionado del grupo que consiste de *Chlorella*, *Parachlorella* y *Prototheca*.

241. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque el medio de cultivo incluye además por lo menos una enzima de utilización de sacarosa.

242. El método de conformidad con la reivindicación 241, caracterizado porque la microalga es del género *Chlorella*.

243. El método de conformidad con la reivindicación 242, caracterizado porque la microalga ha sido diseñada genéticamente para expresar un gen exógeno que codifica por lo menos una enzima de modificación de lípido, enzima de modificación de hidrocarburo o enzima de utilización de sacarosa.

244. El método de conformidad con la reivindicación 241, caracterizado porque el medio de cultivo incluye una invertasa de sacarosa.

245. El método de conformidad con la reivindicación 232, caracterizado porque la microalga es seleccionada de la Tabla 1.

246. Un método para cultivar microalgas caracterizado porque comprende colocar una pluralidad de células de microalgas en presencia de material celulósico despolimerizado.

247. El método de conformidad con la reivindicación 246, caracterizado porque 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 los anteriores.

248. El método de conformidad con la reivindicación 246, caracterizado porque la microalga es seleccionada 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*.

249. El método de conformidad con la reivindicación 248, caracterizado porque la microalga es seleccionada 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.*

250. El método de conformidad con la reivindicación 246, caracterizado porque las microalgas son cultivadas en presencia de por lo menos una enzima de utilización de sacarosa.

251. El método de conformidad con la reivindicación 250, caracterizado porque la microalga es del género *Chlorella.*

252. El método de conformidad con la reivindicación 246, caracterizado porque la microalga ha sido diseñada genéticamente para expresar un gen exógeno que codifica por lo menos una enzima de modificación de lípido, enzima de modificación de hidrocarburo o enzima de utilización de sacarosa.

253. El método de conformidad con la reivindicación 250, caracterizado porque la por lo menos una enzima de utilización de sacarosa es una invertasa de sacarosa.

254. El método de conformidad con la reivindicación 252, caracterizado porque la por lo menos una enzima de modificación de lípido es seleccionada de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

255. El método de conformidad con la reivindicación

252, caracterizado porque la por lo menos una enzima de modificación de hidrocarburo es seleccionada de una acil-ACP tioesterasa grasa, una acil-CoA reductasa grasa, una aldehído reductasa grasa, una acil-CoA/aldehído reductasa grasa, una aldehído decarboxilasa grasa y una proteína portadora de acilo.

256. Un método para cultivar un microbio que produce lípidos, el método está caracterizado porque comprende cultivar el microbio en presencia de ácido acético y en ausencia de una fuente de nitrógeno fija.

257. El método de conformidad con la reivindicación 256, caracterizado porque 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.

258. Un cultivo microbiano caracterizado porque contiene:

(a) una población de microorganismos; y

(b) un medio de cultivo que comprende glucosa, xilosa y una molécula seleccionada del grupo que consiste de lignina y una especie de furfural.

259. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 258, caracterizado porque los microorganismos son microalgas.

260. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 259, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1.

261. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 260, caracterizado porque los microorganismos son una especie del género *Chlorella*.

262. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 261, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de *Chlorella anitrata*, *Chlorella antarctica*, *Chlorella aureoviridis*, *Chlorella Candida*, *Chlorella capsulata*, *Chlorella desiccata*, *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 luteoviridis*, *Chlorella luteoviridis var. aureoviridis*, *Chlorella luteoviridis var. Lutescens*, *Chlorella miniata*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella mutabilis*, *Chlorella nocturna*, *Chlorella parva*, *Chlorella photophila*, *Chlorella pringsheimii*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa*, *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, 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 xanthella y *Chlorella zofingiensis.*

263. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 258, caracterizado porque 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.*

264. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 258, caracterizado porque los microorganismos son levadura oleaginosa.

265. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 264, caracterizado porque la levadura oleaginosa son seleccionadas del grupo que consiste de *Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis* y *Yarrowia lipolytica.*

266. El cultivo microbiano de conformidad con la

reivindicación 258, caracterizado porque los microorganismos son hongos.

267. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 266, caracterizado porque los hongos son seleccionados 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*.

268. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 258, caracterizado porque los microorganismos contienen por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

269. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 268, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa o una fructocinasa.

270. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 258, caracterizado porque los microorganismos contienen por lo menos un gen exógeno que codifica un enzima de ruta de lípido.

271. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 270, caracterizado porque la enzima de ruta de lípido es seleccionado del grupo que consiste de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

272. Un método para la manufactura de biodiesel, el método está caracterizado porque comprende:

(a) cultivar un microorganismo que produce lípidos 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 ésteres de ácido graso y glicerol; y

(d) agregar el glicerol a un segundo cultivo microbiano.

273. El método de conformidad con la reivindicación 272, caracterizado porque los primeros y segundos cultivos microbianos son cultivos de la misma especie de microorganismo.

274. El método de conformidad con la reivindicación 272, caracterizado porque el microorganismo es una microalga.

275. El método de conformidad con la reivindicación 274, caracterizado porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1.

276. El método de conformidad con la reivindicación

275, caracterizado porque el microorganismo es una especie del género *Chlorella*.

277. El método de conformidad con la reivindicación 276, caracterizado porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, 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, 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*

xanthella y *Chlorella zofingiensis*.

278. El método de conformidad con la reivindicación 272, caracterizado porque el segundo cultivo microbiano comprende microorganismos seleccionados del grupo que consiste de *Parachlorella kessleri*, *Chlorella protothecoides*, *Bracteococcus medionucleatus*, *Prototheca moriformis*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella sp.* y *Chlorella sorokiniana*.

279. El método de conformidad con la reivindicación 272, caracterizado porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

280. El método de conformidad con la reivindicación 279, caracterizado porque la levadura oleaginosa es 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*.

281. El método de conformidad con la reivindicación 272, caracterizado porque el microorganismo es un hongo.

282. El método de conformidad con la reivindicación 281, caracterizado porque el hongo es 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*.

283. El método de conformidad con la reivindicación 272, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

284. El método de conformidad con la reivindicación 283, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa o una fructocinasa.

285. El método de conformidad con la reivindicación 272, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido.

286. El método de conformidad con la reivindicación 285, caracterizado porque la enzima de ruta de lípido es seleccionado del grupo que consiste de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

287. Un método de fermentación caracterizado porque comprende cultivar un microorganismo en presencia de glicerol y por lo menos otra fuente de carbono fija.

288. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son provistos al microorganismo simultáneamente a una proporción predeterminada.

289. El método de conformidad con la reivindicación 288, caracterizado porque todo el glicerol y la por lo menos otra fuente de carbono fija son provistos al microorganismo al comienzo de la fermentación.

290. El método de conformidad con la reivindicación 288, caracterizado porque todo del 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.

291. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque

(a) el glicerol es provisto al microorganismo en ausencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija por un primer período de tiempo;

(b) la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al final del primer período de tiempo; y

(c) el microorganismo es cultivado por un segundo período de tiempo en presencia de la por lo menos otra fuente de carbono fija.

292. El método de conformidad con la reivindicación 291, caracterizado porque la por lo menos otra fuente de carbono fija es alimentada al microorganismo a una velocidad predeterminada durante el segundo período de tiempo.

293. El método de conformidad con la reivindicación 291, caracterizado porque todo de la por lo menos otra fuente

de carbono fija es provista al microorganismo al final del primer período de tiempo.

294. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque:

(a) la por lo menos otra fuente de carbono fija es provista al microorganismo en ausencia de glicerol por un primer período de tiempo;

(b) el glicerol es provisto al final del primer período de tiempo; y

(c) el microorganismo es cultivado por un segundo período de tiempo en presencia de glicerol.

295. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque el microorganismo es una microalga.

296. El método de conformidad con la reivindicación 295, caracterizado porque la microalga es seleccionada de la Tabla 1.

297. El método de conformidad con la reivindicación 295, caracterizado porque la microalga es del género *Chlorella*.

298. El método de conformidad con la reivindicación 297, caracterizado porque la microalga es seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, 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 xanthella y *Chlorella zofingiensis.*

299. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

300. El método de conformidad con la reivindicación 299, caracterizado porque la levadura oleaginosa es 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*.

301. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque el microorganismo es un hongo.

302. El método de conformidad con la reivindicación 301, caracterizado porque el hongo es 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*.

303. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen de utiilzación de sacarosa exógeno.

304. El método de conformidad con la reivindicación 303, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa, o una fructocinasa.

305. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido.

306. El método de conformidad con la reivindicación 305, caracterizado porque la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de una estearoil-ACP

desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo, y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

307. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación.

308. El método de conformidad con la reivindicación 307, caracterizado porque el glicerol es acidulado.

309. El método de conformidad con la reivindicación 307, caracterizado porque el glicerol es no acidulado.

310. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque la por lo menos otra fuente de carbono fija es glucosa.

311. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque la por lo menos otra fuente de carbono fija es material celulósico despolimerizado.

312. El método de conformidad con la reivindicación 287, caracterizado porque la por lo menos otra fuente de carbono fija es sacarosa.

313. Un fermentador caracterizado porque comprende:

(a) una población de microorganismos;

(b) glicerol y

(c) por lo menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste de xilosa, glucosa y sacarosa.

314. El fermentador de conformidad con la

reivindicación 313, caracterizado porque el glicerol es un producto secundario de un proceso de transesterificación de lípido.

315. El fermentador de conformidad con la reivindicación 313, caracterizado porque los microorganismos son microalgas.

316. El fermentador de conformidad con la reivindicación 315, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de las microalgas enlistados en la Tabla 1.

317. El fermentador de conformidad con la reivindicación 316, caracterizado porque los microorganismos son una especie del género Chlorella.

318. El fermentador de conformidad con la reivindicación 317, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna,

Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, Chlorella vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, viridis, Chlorella xanthella, y Chlorella zofingiensis.

319. El fermentador de conformidad con la reivindicación 313, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca mori/ormis, Chlorella minutissima, Chlorella sp., y Chlorella sorokiniana.

320. El fermentador de conformidad con la reivindicación 313, caracterizado porque los microorganismos son levadura oleaginosa.

321. El fermentador de conformidad con la reivindicación 320, caracterizado porque la levadura oleaginosa son seleccionadas del grupo que consiste de Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces

starkeyi, Lipomyces lipo/er, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis, y Yarrowia lipolytica.

322. El fermentador de conformidad con la reivindicación 313, caracterizado porque los microorganismos son hongos.

323. El fermentador de conformidad con la reivindicación 322, caracterizado porque los hongos son seleccionados 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.

324. El fermentador de conformidad con la reivindicación 313, caracterizado porque los microorganismos contienen por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

325. El fermentador de conformidad con la reivindicación 324, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa, o una fructocinasa.

326. El fermentador de conformidad con la

reivindicación 313, caracterizado porque los microorganismos contienen por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido.

327. El fermentador de conformidad con la reivindicación 326, caracterizado porque la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo, y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

328. Un método para la fermentación de un microorganismo caracterizado porque comprende proveer glicerol producto secundario de un proceso de transesterificación como una sola fuente de energía de carbono fijo.

329. El método de conformidad con la reivindicación 328, caracterizado porque no se proporciona energía de luz al microorganismo.

330. El método de conformidad con la reivindicación 328, caracterizado porque se proporciona energía de luz al microorganismo.

331. El método de conformidad con la reivindicación 328, caracterizado porque el microorganismo es una microalga.

332. El método de conformidad con la reivindicación 331, caracterizado porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de las microalgas enlistados en la Tabla 1.

333. El método de conformidad con la reivindicación

332, caracterizado porque el microorganismo es una especie del género Chlorella.

334. El método de conformidad con la reivindicación 333, caracterizado porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviŕdis, Chlorella Candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, Chlorella vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, viridis, Chlorella xanthella, y

332, caracterizado porque el microorganismo es una especie del género Chlorella.

334. El método de conformidad con la reivindicación 333, caracterizado porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviŕdis, Chlorella Candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, Chlorella vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, viridis, Chlorella xanthella, y

Chlorella zofingiensis.

335. El método de conformidad con la reivindicación 328, caracterizado porque el microorganismo es seleccionado de Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca mori/ormis, Chlorella minutissima, Chlorella sp., y Chlorella sorokiniana.

336. El método de conformidad con la reivindicación 328, caracterizado porque el microorganismo es una levadura oleaginosa.

337. El método de conformidad con la reivindicación 336, caracterizado porque la levadura oleaginosa es seleccionada del grupo que consiste de Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipo/er, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis, y Yarrowia lipolytica.

338. El método de conformidad con la reivindicación 328, caracterizado porque el microorganismo es un hongo.

339. El método de conformidad con la reivindicación 338, caracterizado porque el hongo es 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.

340. El método de conformidad con la reivindicación 328, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

341. El método de conformidad con la reivindicación 340, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa, o una fructocinasa.

342. El método de conformidad con la reivindicación 328, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido.

343. El método de conformidad con la reivindicación 342, caracterizado porque la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo, y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

344. Un microorganismo caracterizado porque contiene un gen de utilización de sacarosa exógeno.

345. El microorganismo de conformidad con la reivindicación 344, caracterizado porque el gen codifica un transportador de sacarosa.

346. El microorganismo de conformidad con la reivindicación 344, caracterizado porque el gen codifica una invertasa de sacarosa.

347. El microorganismo de conformidad con la reivindicación 344, caracterizado porque el gen codifica una fructocinasa.

348. El microorganismo de conformidad con la reivindicación 344, caracterizado porque el microorganismo es una microalga.

349. El microorganismo de conformidad con la reivindicación 348, caracterizado porque el microorganismo es seleccionado del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1.

350. El microorganismo de conformidad con la reivindicación 349, caracterizado porque el microorganismo es una especie del género Chlorella.

351. El microorganismo de conformidad con la reivindicación 350, caracterizado porque el microorganismo es una especie seleccionada del grupo que consiste de Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp., o Chlorella protothecoides.

352. Una célula de la especie Chlorella protothecoides, Chlorella emersonii, o Chlorella minutissima caracterizado porque la célula contiene un gen exógeno.

353. La célula de conformidad con la reivindicación 352, caracterizada porque el gen exógeno codifica una proteína seleccionado del grupo que consiste de un transportador de

sacarosa, una invertasa de sacarosa, una enzima de modificación de lípido, una enzima de modificación de hidrocarburo y una fructocinasa.

354. La célula de conformidad con la reivindicación 353, caracterizada porque la proteína es una invertasa de sacarosa secretada al espacio extracelular.

355. La célula de conformidad con la reivindicación 353, caracterizada porque la proteína es una invertasa de sacarosa apuntada al citoplasma.

356. Un cultivo microbiano caracterizado porque contiene:

(a) una población de microorganismos y

(b) un medio de cultivo que comprende (i) sacarosa, y (ii) una enzima de invertasa de sacarosa.

357. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 356, caracterizado porque los microorganismos son microalgas.

358. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 357, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1.

359. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 358, caracterizado porque los microorganismos son una especie del género Chlorella.

360. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 359, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, 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, Chlorella vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, viridis, Chlorella xanthella, y Chlorella zofingiensis.

361. El cultivo microbiano de conformidad con la

reivindicación 356, caracterizado porque los microorganismos son levadura oleaginosa.

362. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 361, caracterizado porque la levadura oleaginosa son seleccionados del grupo que consiste de Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis, y Yarrowia lipolytica.

363. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 356, caracterizado porque los microorganismos son hongos.

364. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 363, caracterizado porque los hongos son seleccionado del grupo que consiste de una especie del género Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Miicor 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.

365. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 356, caracterizado porque los microorganismos contienen por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

366. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 365, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa, o una fructocinasa.

367. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 366, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa.

368. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 356, caracterizado porque la enzima de sacarosa invertasa es una enzima de sacarosa invertasa secretable codificada por un gen de sacarosa invertasa exógeno expresado por la población de microorganismos.

369. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 356, caracterizado porque el microorganismo contiene por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido.

370. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 369, caracterizado porque la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo, y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

371. Un cultivo microbiano caracterizado porque contiene:

(a) una población de microorganismos y

(b) un medio de cultivo que comprende (i) melasas y (ii) una enzima de sacarosa invertasa.

372. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 371, caracterizado porque los microorganismos son microalgas.

373. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 372, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de las microalgas enlistados en la Tabla 1.

374. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 373, caracterizado porque los microorganismos son una especie del género Chlorella.

375. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 374, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna,

Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella regular is, 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, Chlorella vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, y Chlorella zofingiensis.

376. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 371 , caracterizado porque los microorganismos son levadura oleaginosa.

377. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 376, caracterizado porque las levaduras oleaginosas son seleccionadas del grupo que consiste de Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis, y Yarrowia lipolytica.

378. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 371, caracterizado porque los microorganismos son hongos.

379. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 378, caracterizado porque los hongos son seleccionados 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.

380. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 371, caracterizado porque el microorganismo contienen por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

381. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 380, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una invertasa de sacarosa, una hexocinasa, una glucocinasa, o una fructocinasa.

382. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 381, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa.

383. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 371, caracterizado porque la enzima de sacarosa invertasa es una enzima de sacarosa invertasa secretable

codificada por un gen de sacarosa invertasa exógeno expresado por la población de microorganismos.

384. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 371, caracterizado porque los microorganismos contienen por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido.

385. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 384, caracterizado porque la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de una esteaoril-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo, y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

386. Un cultivo microbiano caracterizado porque contiene:

(a) una población de microorganismos y

(b) un medio de cultivo que comprende (i) sacarosa; (ii) lignina y (iii) una enzima de sacarosa invertasa.

387. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 386, caracterizado porque los microorganismos son microalgas.

388. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 387, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla1.

389. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 388, caracterizado porque los microorganismos son una especie del género Chlorella.

390. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 389, caracterizado porque los microorganismos son seleccionados del grupo que consiste de Chlorella anitrata, Chlorella antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella Candida, Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, 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 luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella regularis, Chlorella regular is 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, Chlorella vulgaris/, tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris/, tertia,

Chlorella vulgaris var. vulgaris/, viridis, Chlorella xanthella, y Chlorella zofingiensis.

391. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 386, caracterizado porque los microorganismos son levadura oleaginosa.

392. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 391, caracterizado porque la levadura oleaginosa son seleccionadas del grupo que consiste de Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipo/er, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis, y Yarrowia lipolytica.

393. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 386, caracterizado porque los microorganismos son hongos.

394. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 393, caracterizado porque los hongos son seleccionados 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.

395. El cultivo microbiano de conformidad con la

reivindicación 386, caracterizado porque los microorganismos contienen por lo menos un gen de utilización de sacarosa exógeno.

396. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 395, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa, una sacarosa invertasa, una hexocinasa, una glucocinasa, o una fructocinasa.

397. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 396, caracterizado porque el gen de utilización de sacarosa codifica un transportador de sacarosa.

398. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 386, caracterizado porque la enzima de sacarosa invertasa es una enzima de sacarosa invertasa secretable codificada por un gen de sacarosa invertasa exógeno expresado por la población de microorganismos.

399. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 386, caracterizado porque los microorganismos contienen por lo menos un gen exógeno que codifica una enzima de ruta de lípido.

400. El cultivo microbiano de conformidad con la reivindicación 399, caracterizado porque la enzima de ruta de lípido es seleccionada del grupo que consiste de una estearoil-ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo, y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa.

401. Un ácido nucleico caracterizado porque comprende:

(a) un cADN que codifica un gen de utilización de sacarosa y

(b) un cADN que codifica una proteína que confiere resistencia al antibiótico higromicina o el antibiótico G418.

402. Un método para cultivar microalgas, caracterizado porque comprende:

(a) proveer una célula de microalga apta de efectuar crecimiento heterotrópico;

(b) colocar la célula de microalga en un medio de cultivo, en donde el medio de cultivo comprende material celulósico despolimerizado y

(c) incubar las microalgas por un periodo de tiempo suficiente para permitir que las células crezcan.

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.

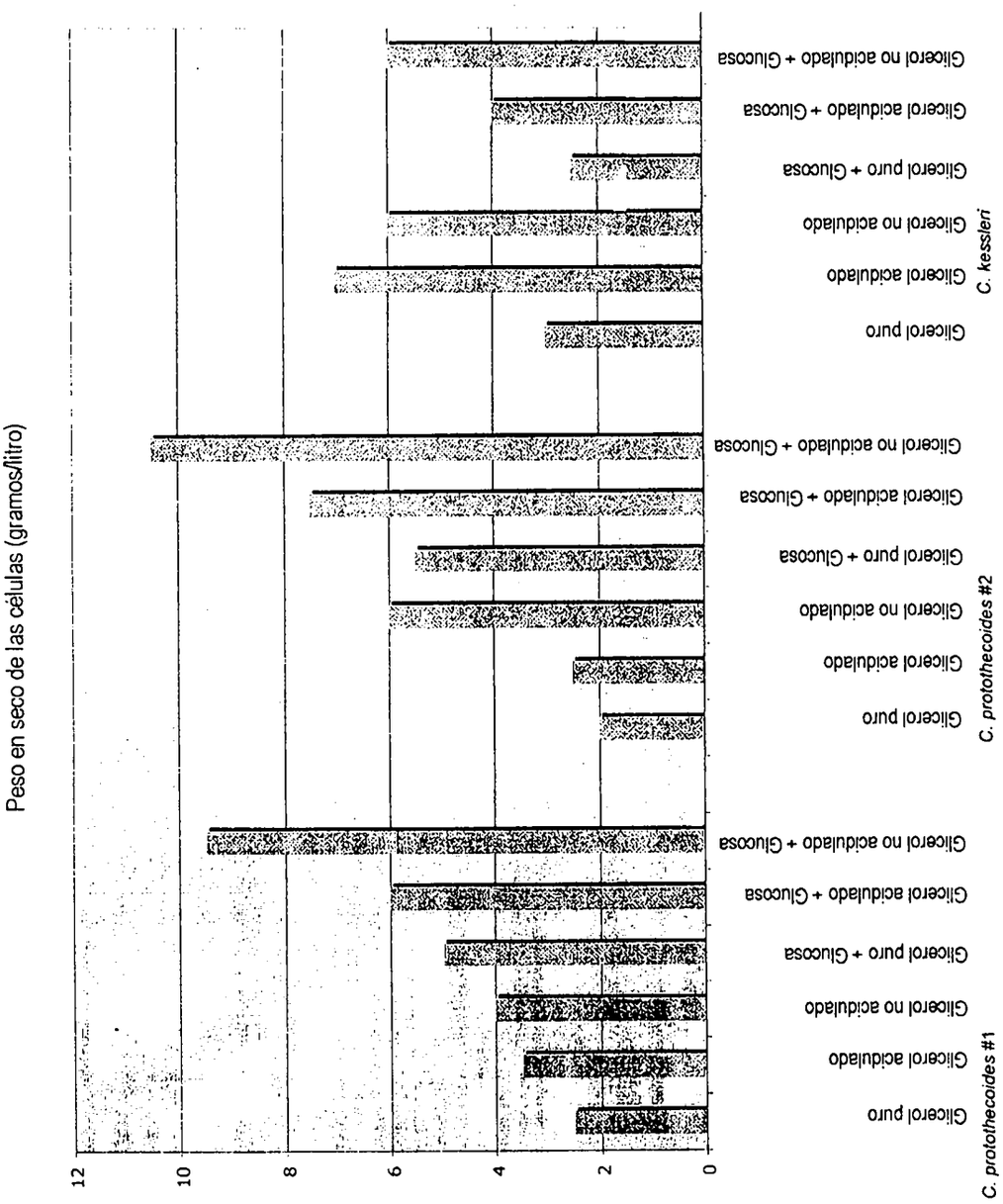
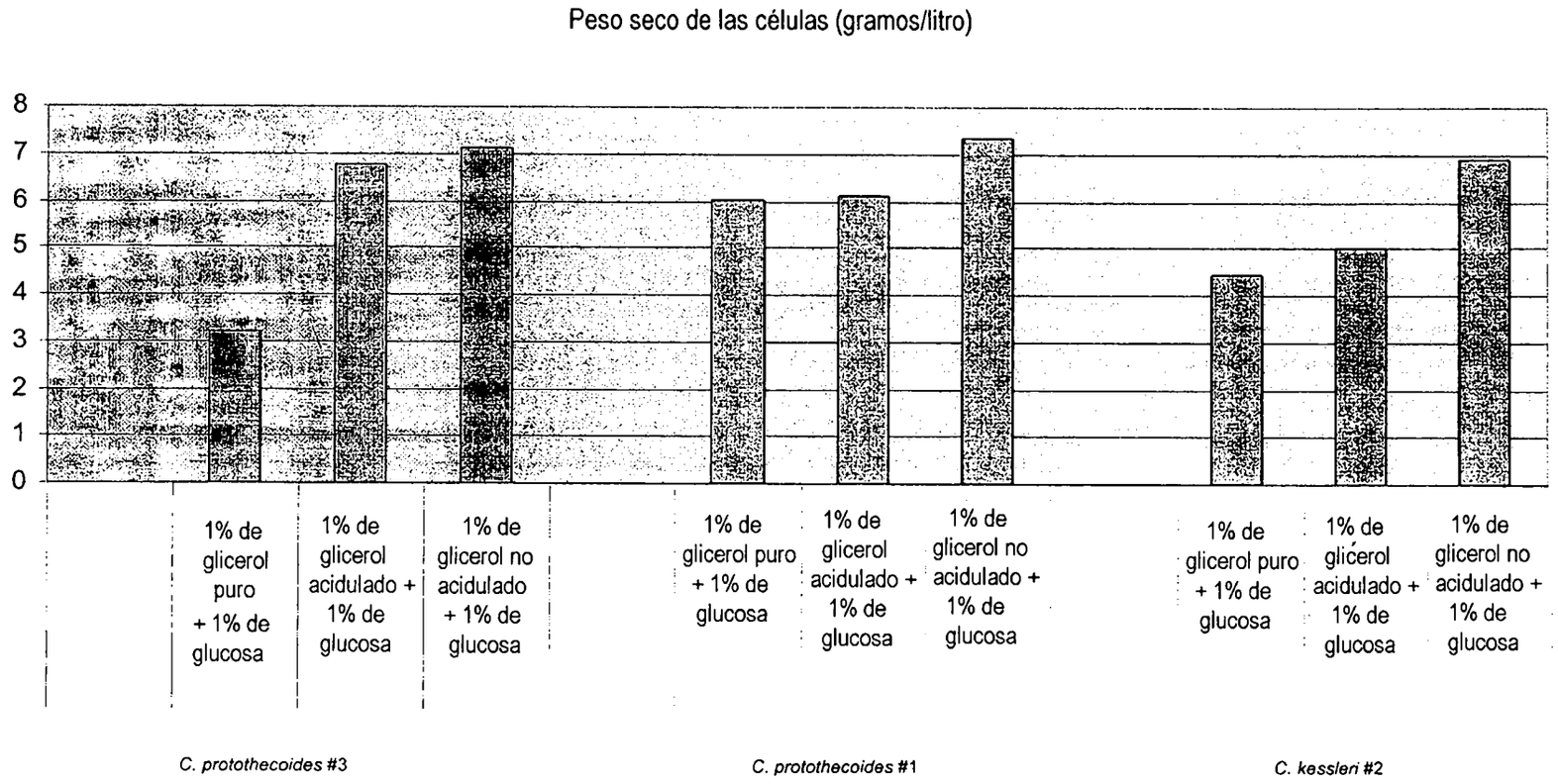

Peso en seco de las células (gramos/litro)
12
10
8
6
4
2
0
C. protothecoides #1
Glicerol puro
Glicerol acidulado
Glicerol no acidulado
Glicerol puro + Glucosa
Glicerol acidulado + Glucosa
Glicerol no acidulado + Glucosa
C. protothecoides #2
Glicerol puro
Glicerol acidulado
Glicerol no acidulado
Glicerol puro + Glucosa
Glicerol acidulado + Glucosa
Glicerol no acidulado + Glucosa
C. kessleri
Glicerol puro
Glicerol acidulado
Glicerol no acidulado
Glicerol puro + Glucosa
Glicerol acidulado + Glucosa
Glicerol no acidulado + Glucosa

Figura 1

Figura 2


Peso seco de las células (gramos/litro)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1% de glicerol puro + 1% de glucosa
1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol no acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol puro + 1% de glucosa
1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol no acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol puro + 1% de glucosa
1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol no acidulado + 1% de glucosa
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1
C. kessleri #2

423

Figura 3

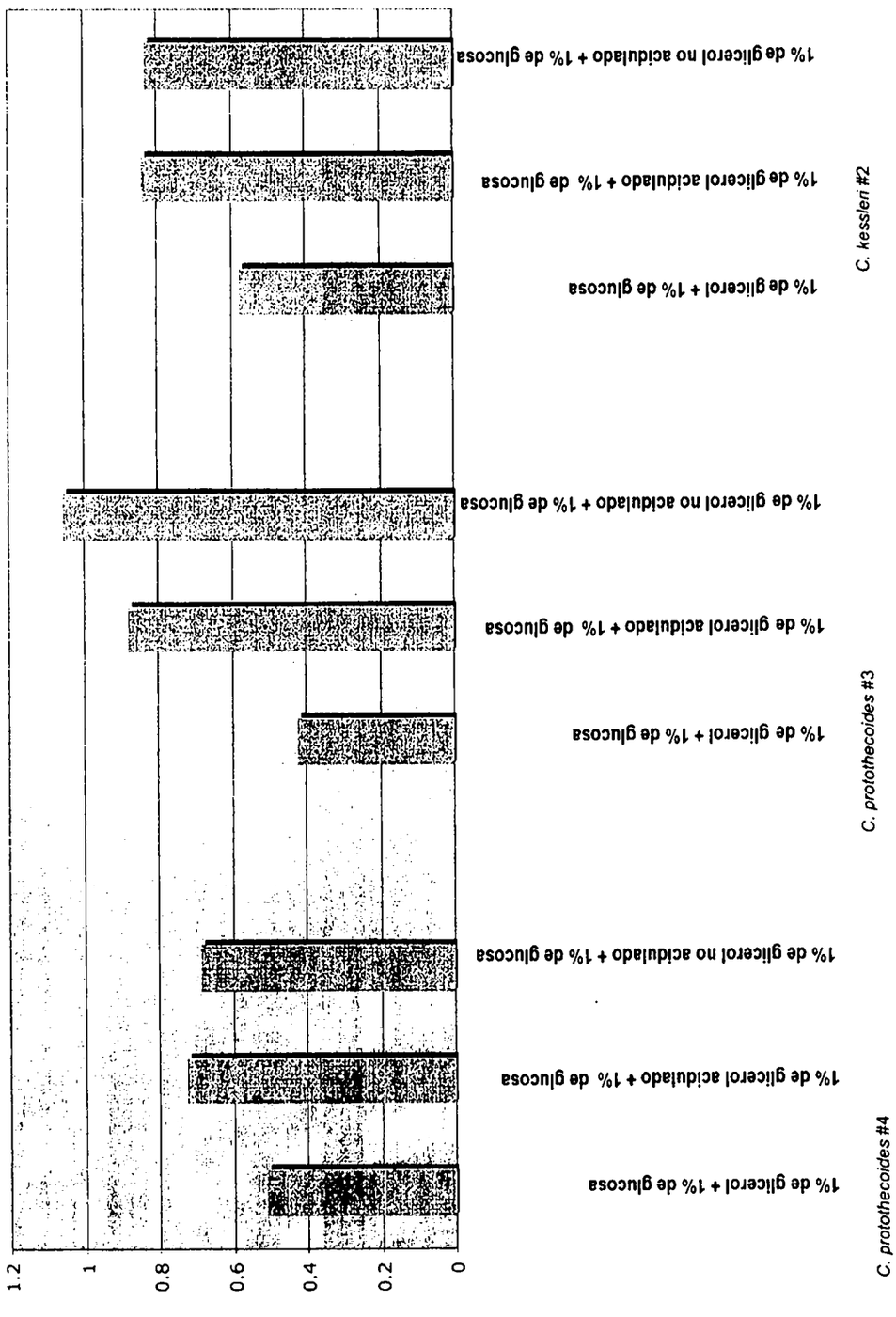

Lípidos a OD 530 nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1% de glicerol + 1% de glucosa
1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol no acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol + 1% de glucosa
1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol no acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol + 1% de glucosa
1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
1% de glicerol no acidulado + 1% de glucosa
C. protothecoides #4
C. protothecoides #3
C. kessleri #2

Figura 4

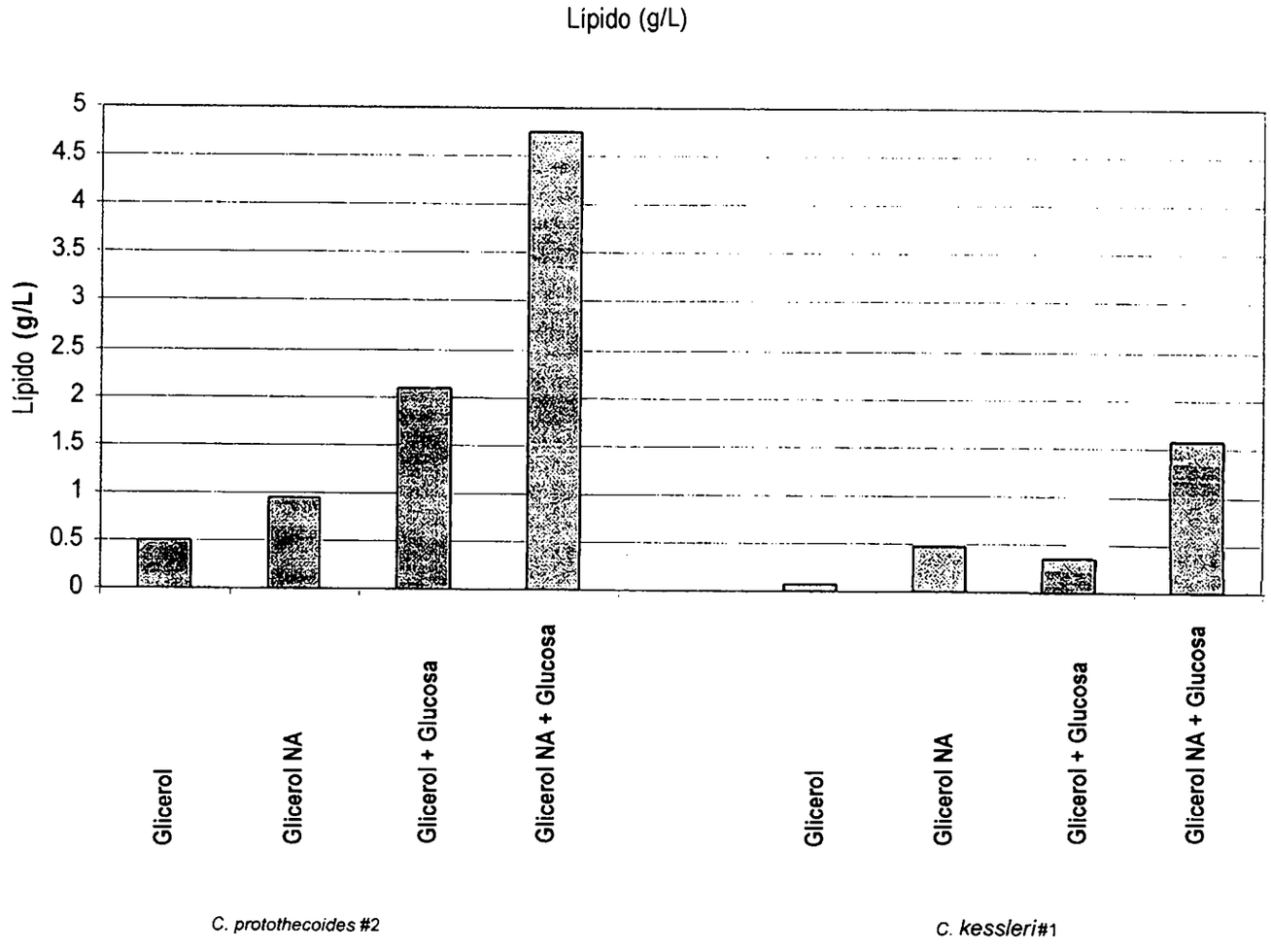
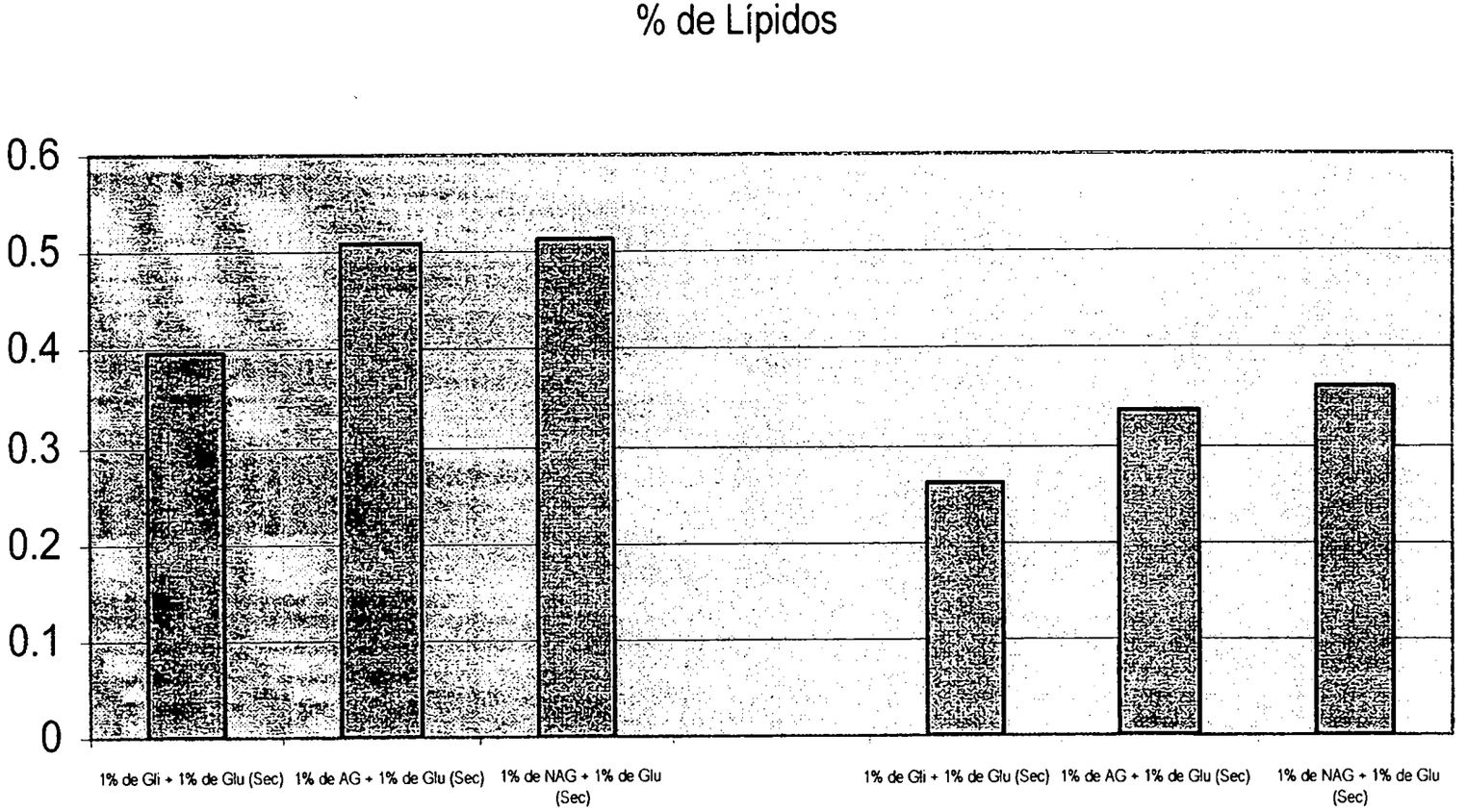
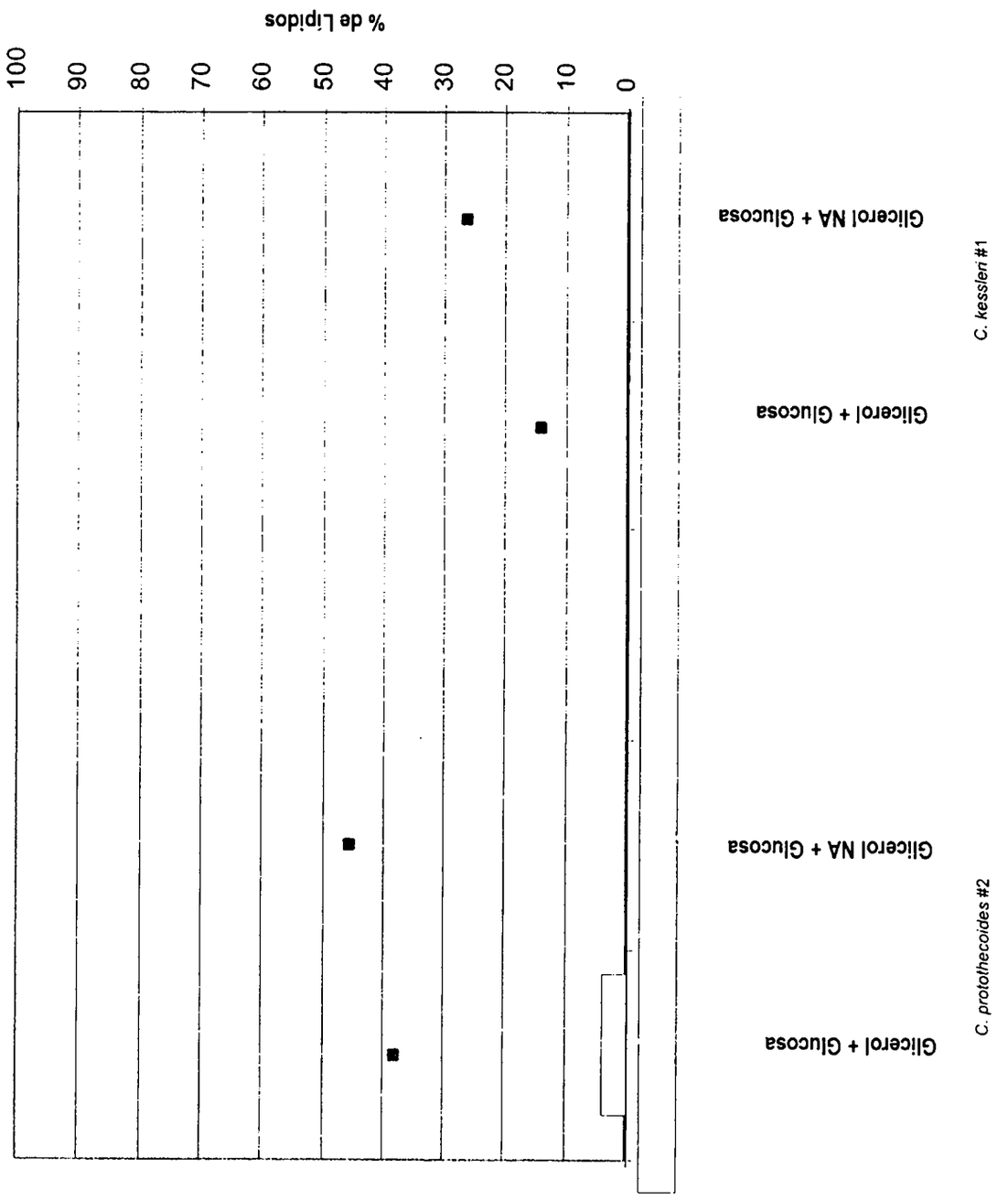

Lípido (g/L)
Lípido (g/L)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Glicerol
Glicerol NA
Glicerol + Glucosa
Glicerol NA + Glucosa
Glicerol
Glicerol NA
Glicerol + Glucosa
Glicerol NA + Glucosa
C. protothecoides #2
C. kessleri #1

Figura 5


% de Lípidos
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1% de Gli + 1% de Glu (Sec)
1% de AG + 1% de Glu (Sec)
1% de NAG + 1% de Glu (Sec)
1% de Gli + 1% de Glu (Sec)
1% de AG + 1% de Glu (Sec)
1% de NAG + 1% de Glu (Sec)
C. protothecoides #3
C. kessleri #2

424

Figura 6


% de Lipidos
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Glicerol + Glucosa
Glicerol NA + Glucosa
Glicerol + Glucosa
Glicerol NA + Glucosa
C. protothecoides #2
C. kessleri #1

425

Figura 7

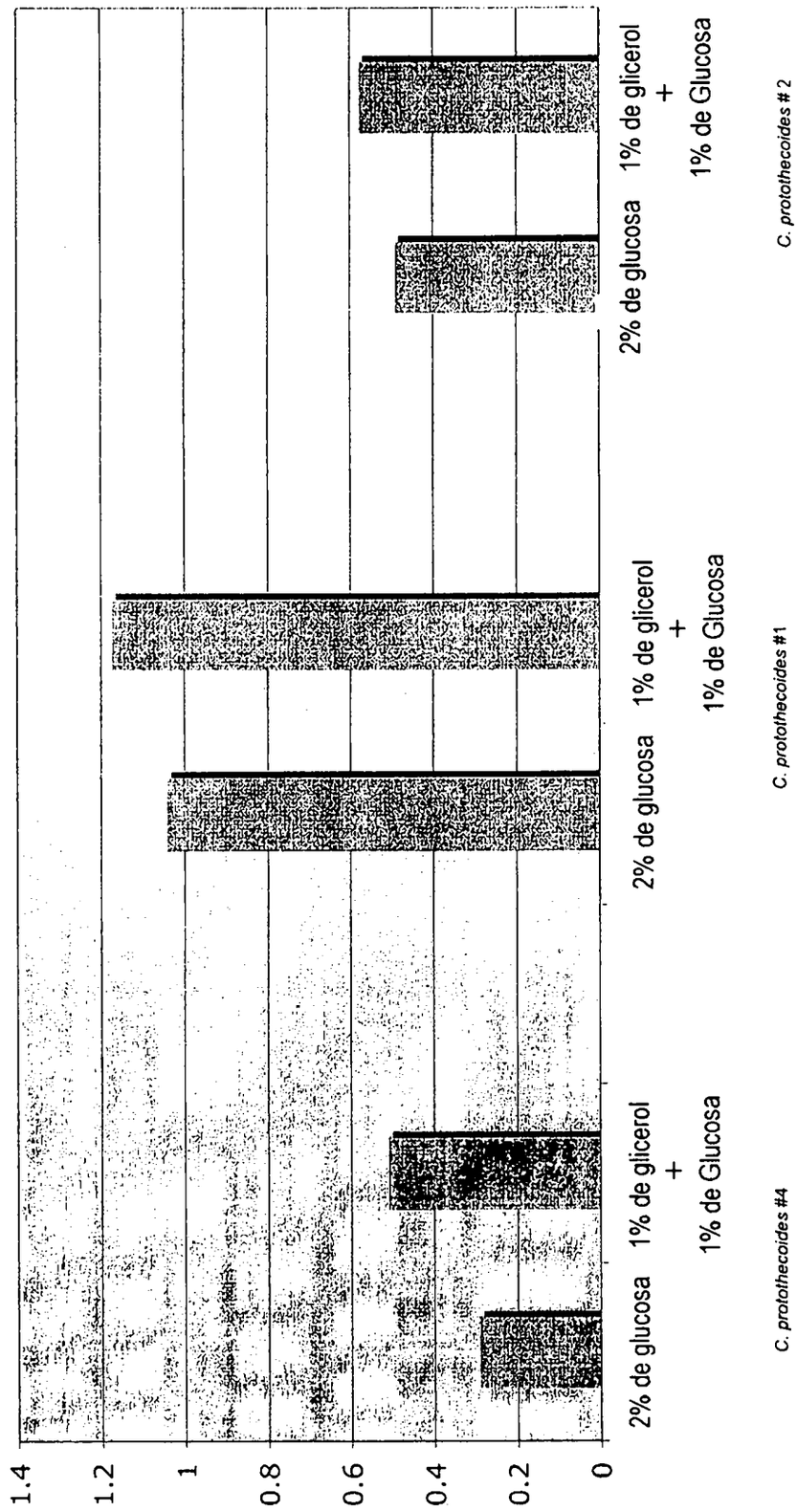
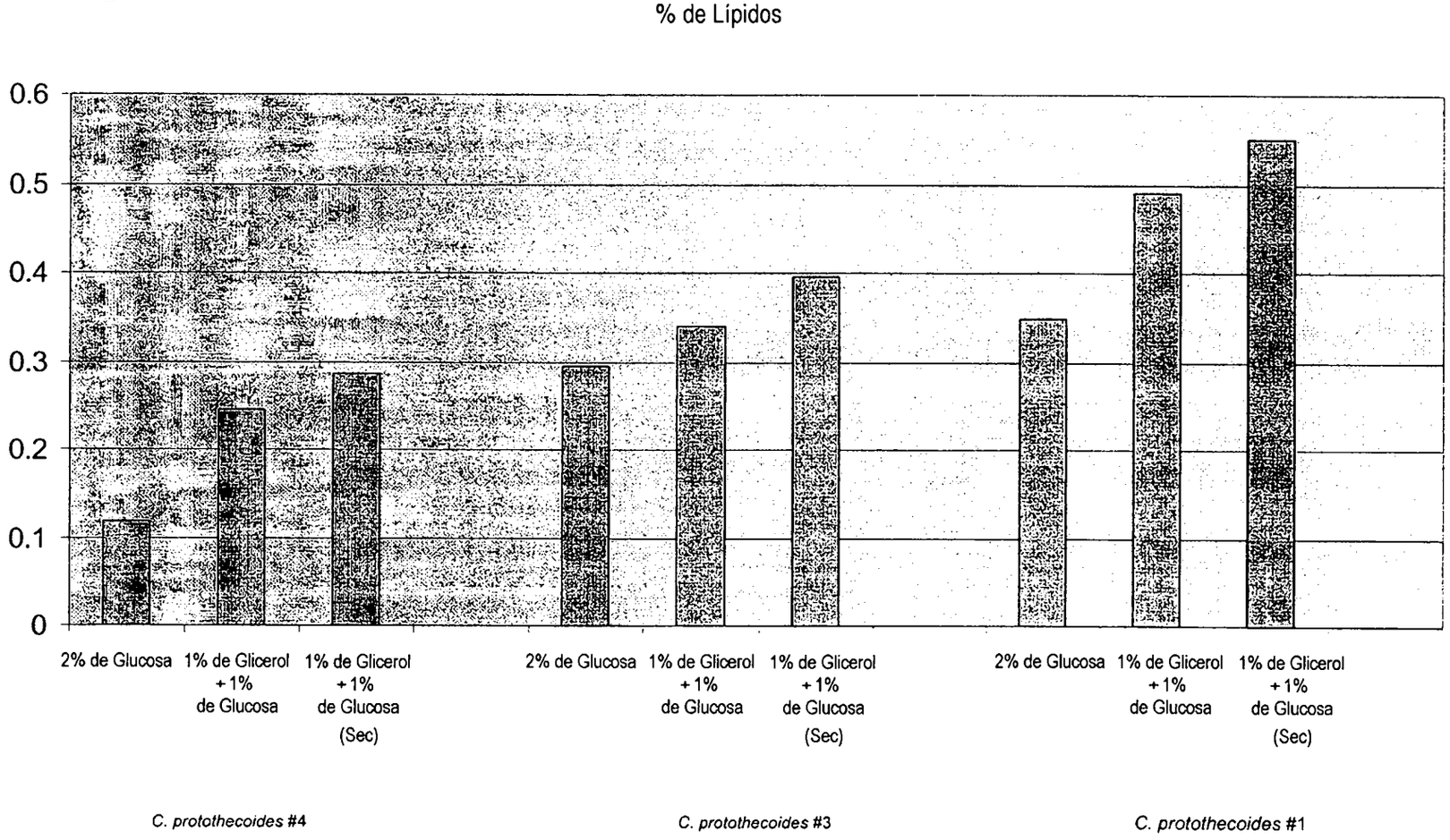

Lípido a OD de 530 nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2% de glucosa 1% de glicerol + 1% de Glucosa
C. protothecoides #4
2% de glucosa 1% de glicerol + 1% de Glucosa
C. protothecoides #1
2% de glucosa 1% de glicerol + 1% de Glucosa
C. protothecoides # 2

Figura 8


% de Lípidos
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
2% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
2% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
C. protothecoides #4
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1

426

Figura 9

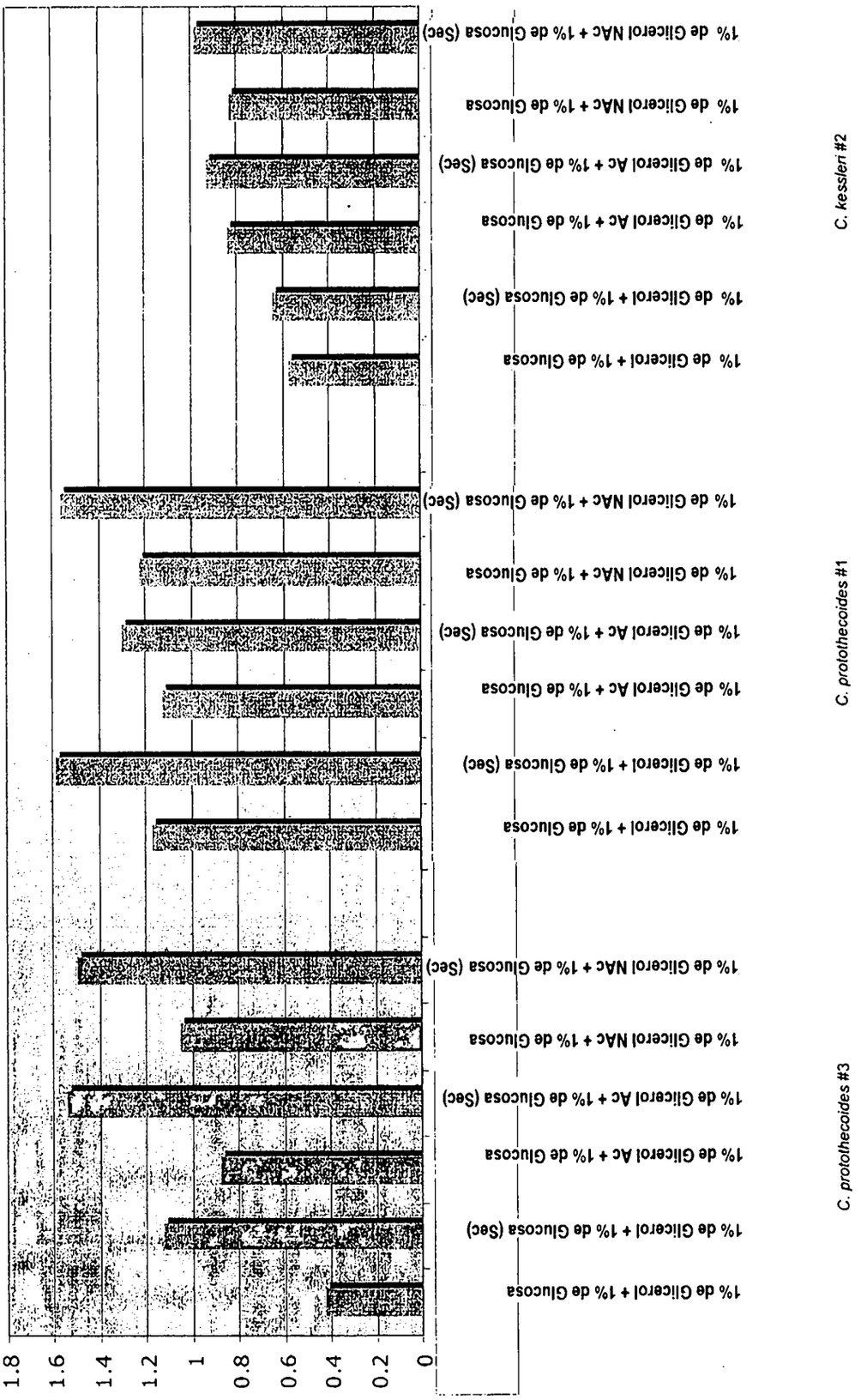
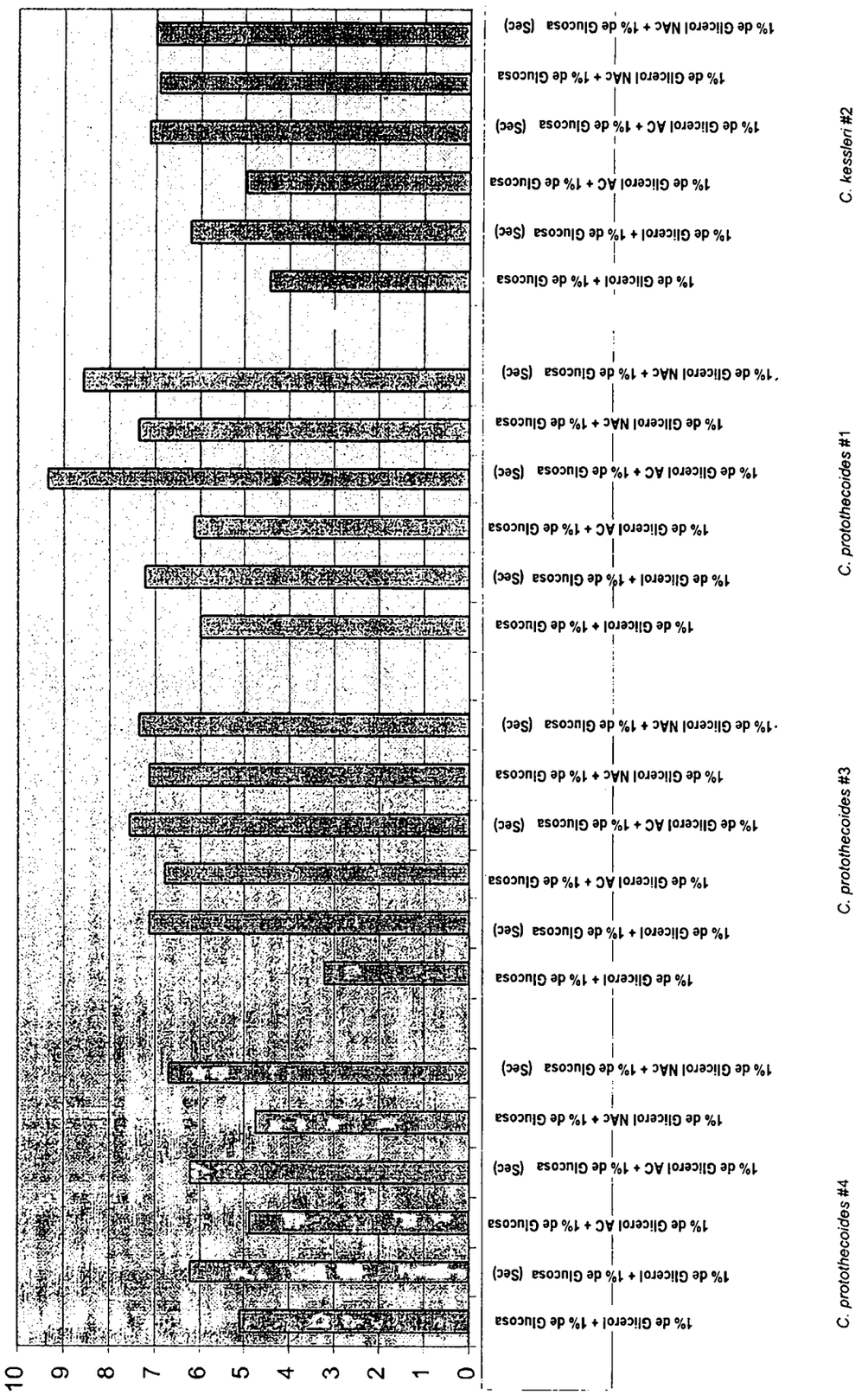

Lípidos a OD de 530 nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol Ac + 1% de Glucosa
1% de Glicerol Ac + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa (Sec)
C. protothecoides #3
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol Ac + 1% de Glucosa
1% de Glicerol Ac + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa (Sec)
C. protothecoides #1
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol Ac + 1% de Glucosa
1% de Glicerol Ac + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa (Sec)
C. kessleri #2

Figura 10


Peso seco de células (gramos/litro)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol AC + 1% de Glucosa
1% de Glicerol AC + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa (Sec)
C. protothecoides #4
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol AC + 1% de Glucosa
1% de Glicerol AC + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa (Sec)
C. protothecoides #3
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol AC + 1% de Glucosa
1% de Glicerol AC + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa (Sec)
C. protothecoides #1
1% de Glicerol + 1% de Glucosa
1% de Glicerol + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol AC + 1% de Glucosa
1% de Glicerol AC + 1% de Glucosa (Sec)
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa
1% de Glicerol NAc + 1% de Glucosa (Sec)
C. kessleri #2

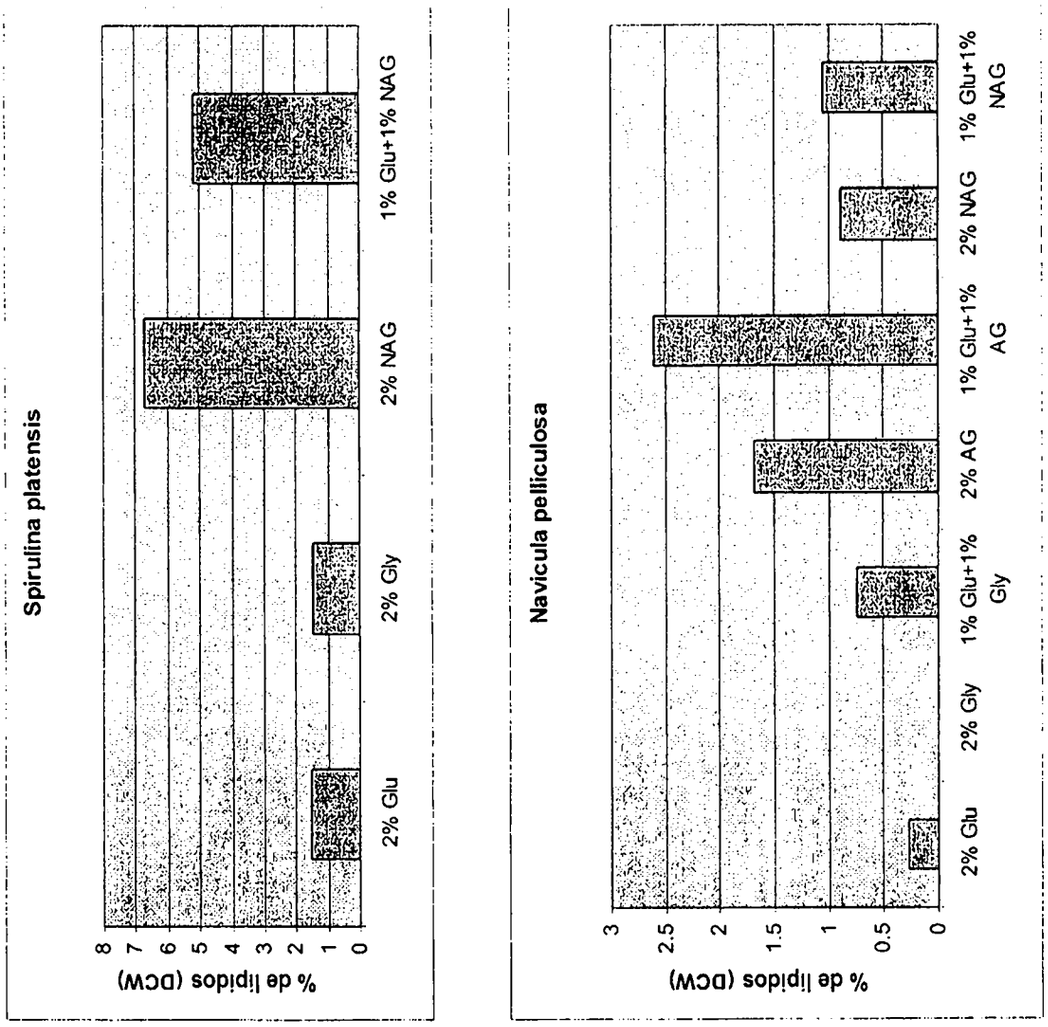
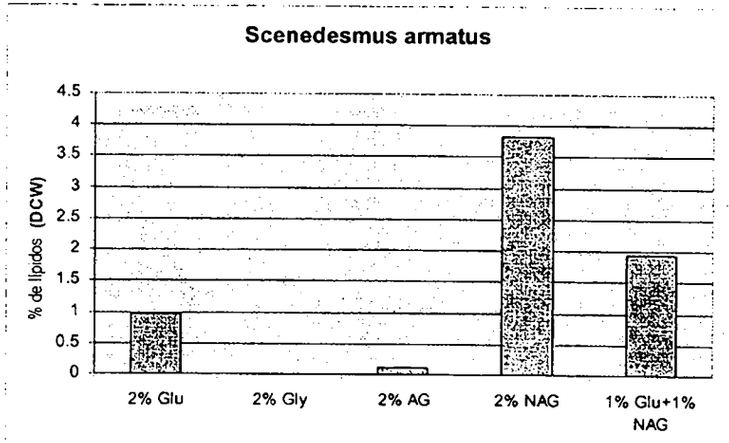

Spirulina platensis
% de lípidos (DCW)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
2% Glu
2% Gly
2% NAG
1% Glu+1% NAG
(a)
Navicula pelliculosa
% de lípidos (DCW)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
2% Glu
2% Gly
1% Glu+1% Gly
2% AG
1% Glu+1% AG
2% NAG
1% Glu+1% NAG
(b)

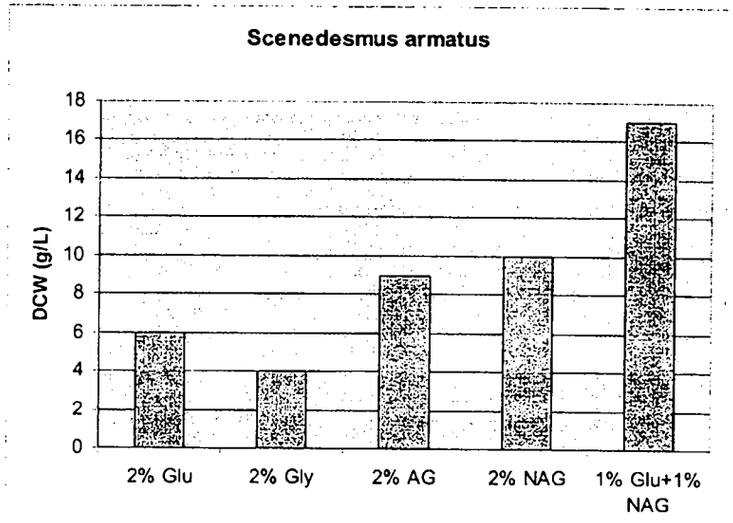
Figura 11

Figura 12

(a)


Scenedesmus armatus
% de lípidos (DCW)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
2% Glu
2% Gly
2% AG
2% NAG
1% Glu+1% NAG

(b)


Scenedesmus armatus
DCW (g/L)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
2% Glu
2% Gly
2% AG
2% NAG
1% Glu+1% NAG

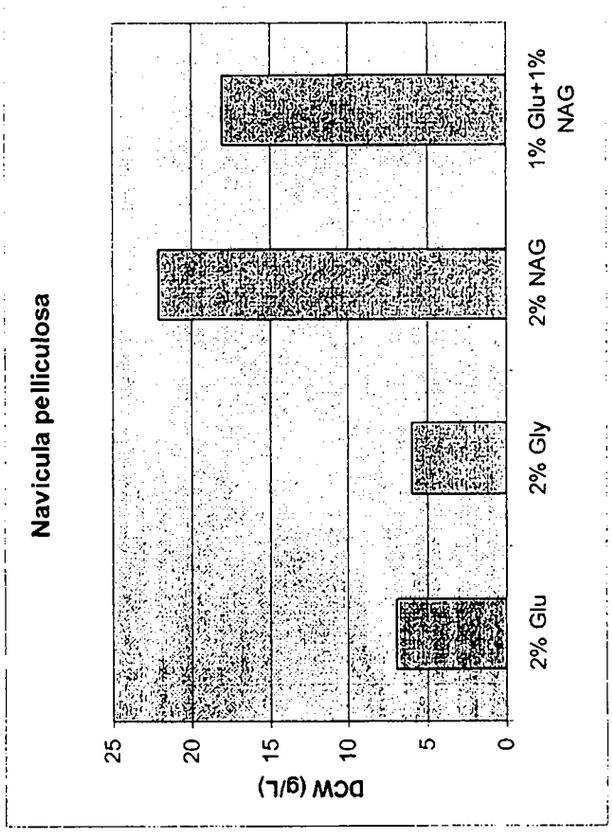
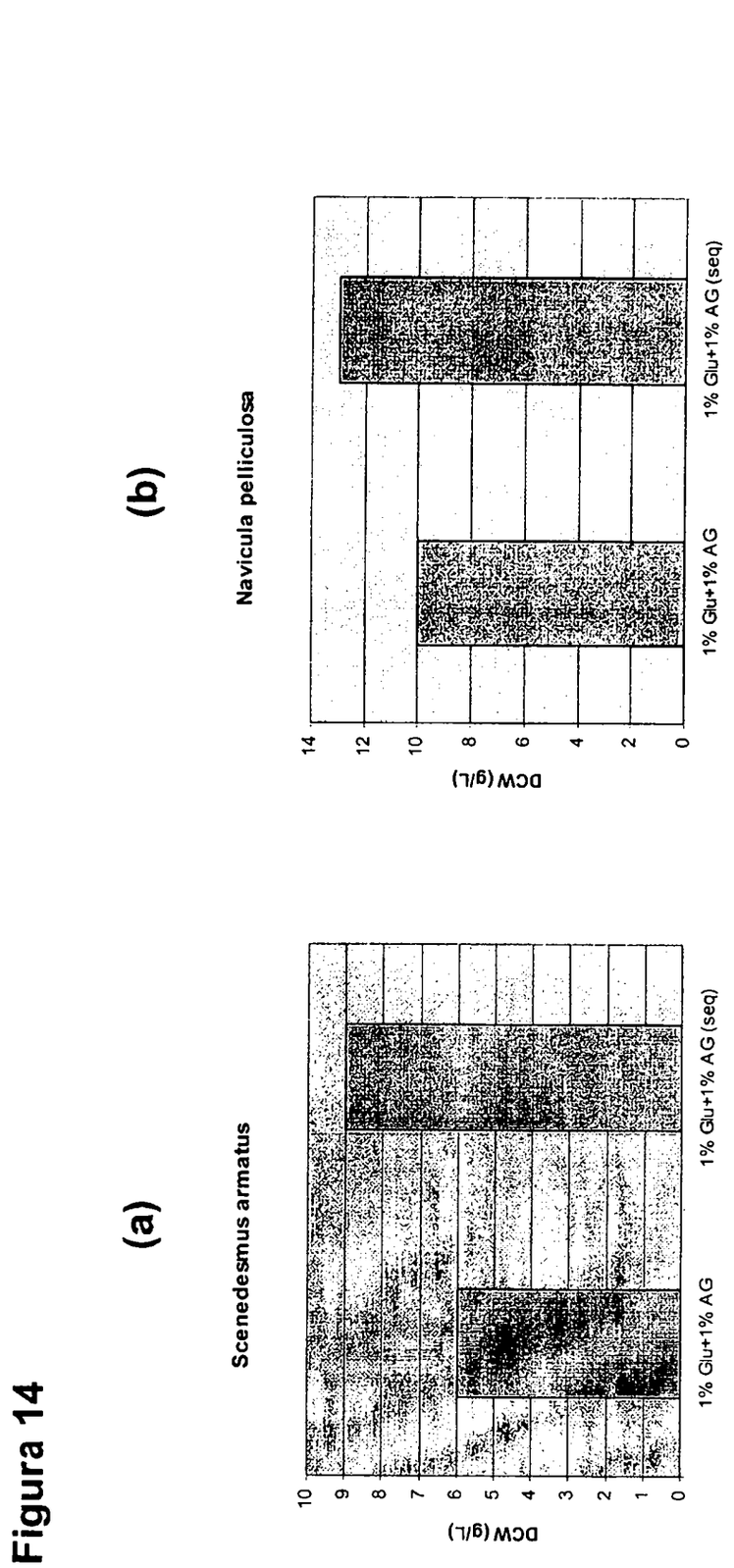

Navicula pelliculosa
DCW (g/L)
25
20
15
10
5
0
2% Glu
2% Gly
2% NAG
1% Glu+1% NAG

Figura 13

Figura 14


(a)
Scenedesmus armatus
DCW (g/L)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1% Glu+1% AG
1% Glu+1% AG (seq)
(b)
Navicula pellicolosa
DCW (g/L)
0
2
4
6
8
10
12
14
1% Glu+1% AG
1% Glu+1% AG (seq)

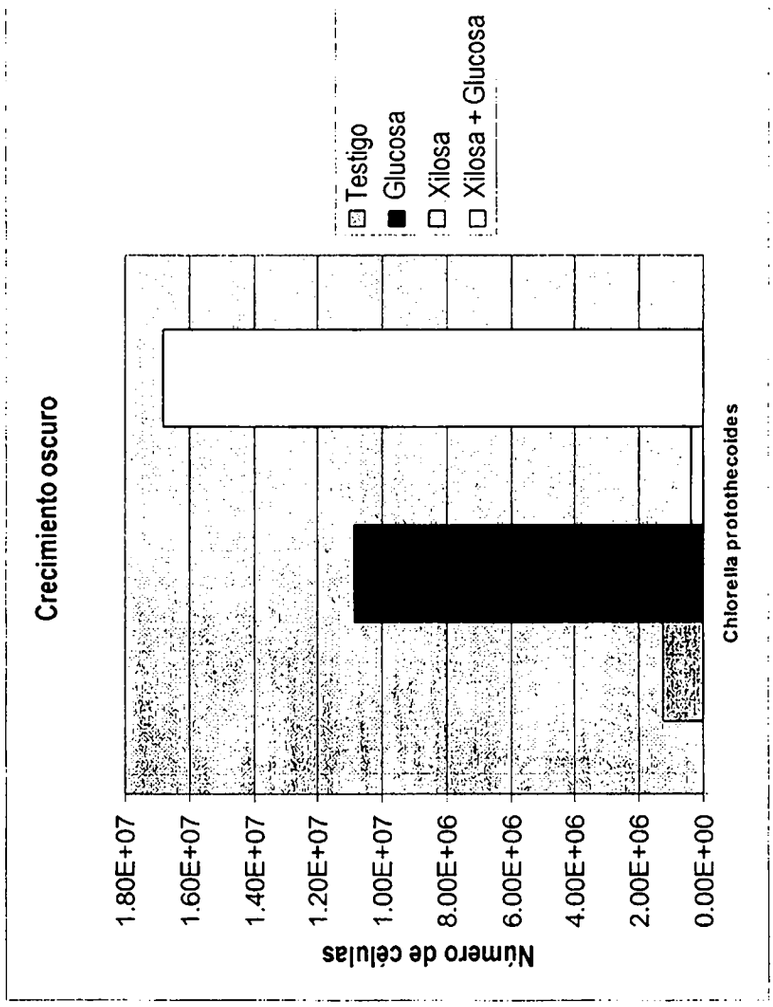
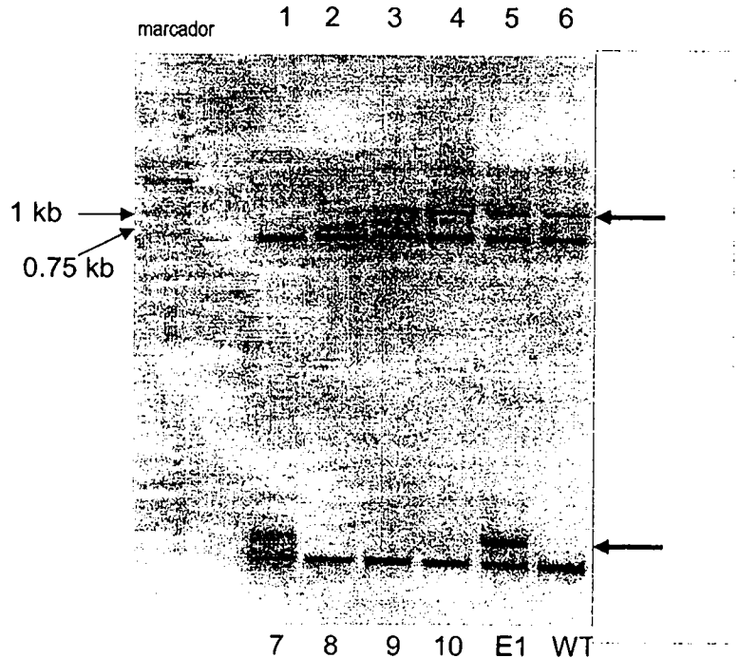

Crecimiento oscuro
Testigo
Glucosa
Xilosa
Xilosa + Glucosa
Número de células
1.80E+07
1.60E+07
1.40E+07
1.20E+07
1.00E+07
8.00E+06
6.00E+06
4.00E+06
2.00E+06
0.00E+00
Chlorella protothecoides

Figura 15

Figura 16



Líneas 1-10: transformantes biolísticos
Línea E1: transformante de electroporación
Línea: ADN genómico WT

Figura 17

Tabla de uso de codones de *Chlorella protothecoides*

Phe	UUU	39	(0.82)	Ser	UCU	50	(1.04)
	UUC	56	(1.18)		UCC	60	(1.25)
Leu	UUA	10	(0.20)		UCA	46	(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	63	(1.12)		CGC	63	(1.23)
Gln	CAA	59	(0.84)		CGA	46	(0.90)
	CAG	82	(1.16)		CGG	47	(0.92)
Ile	AUU	24	(0.69)	Thr	ACU	32	(0.67)
	AUC	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	43	(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)

Figura 18

A. Codones más preferidos de 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)

B. Codones más preferidos de Chlorella pyrenoidosa

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)

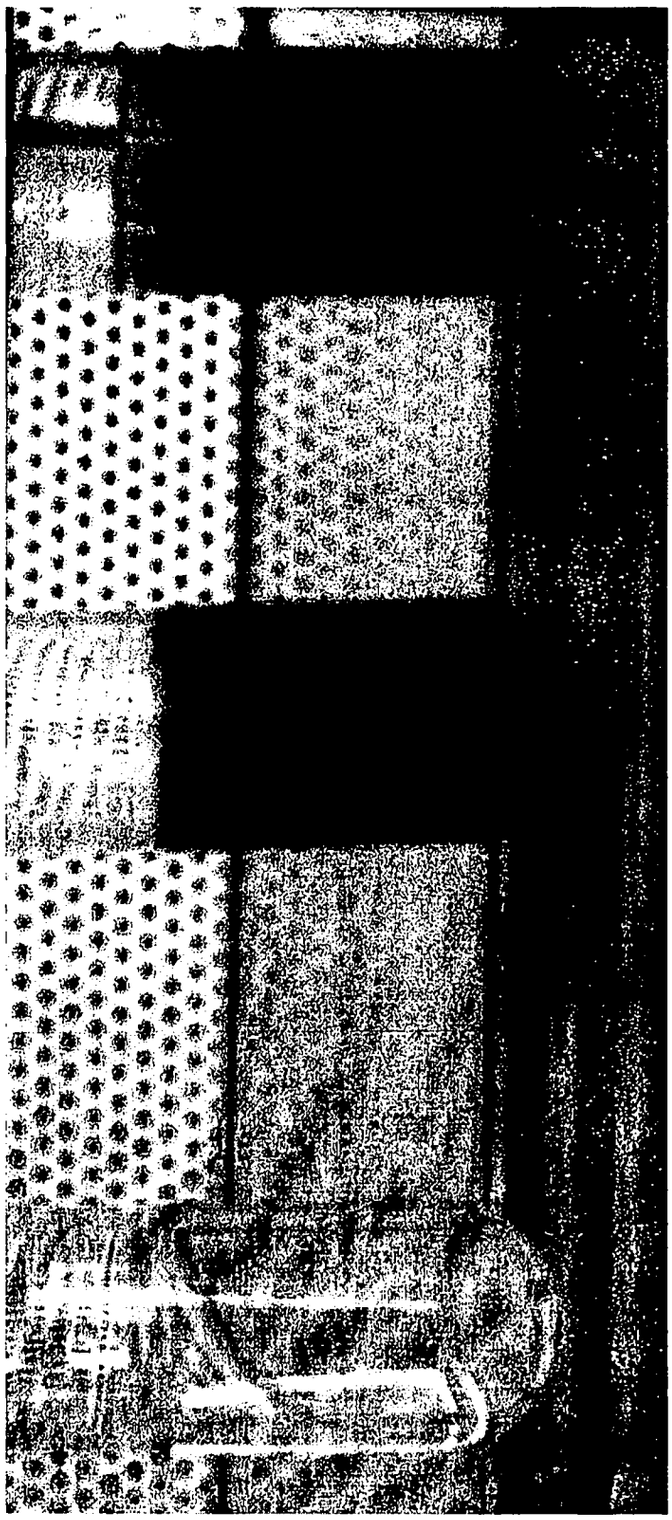


Figura 19

Figura 20

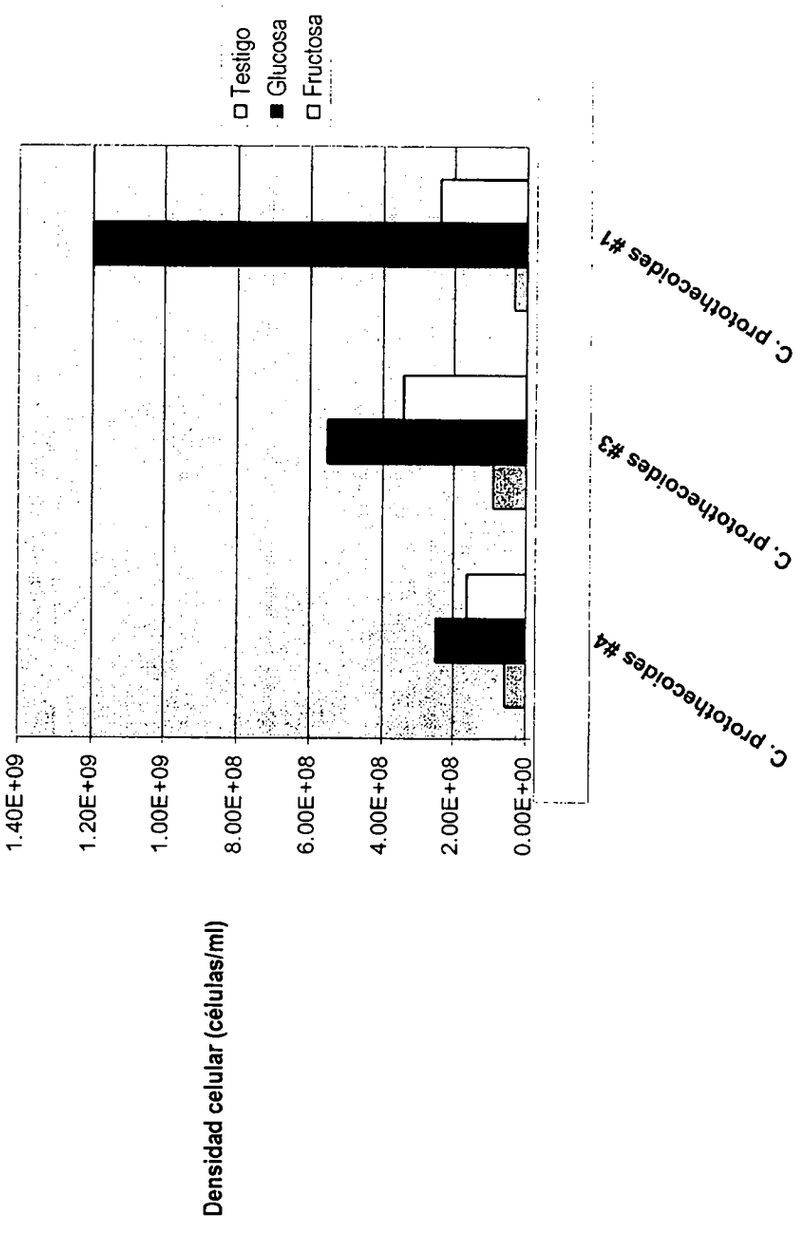
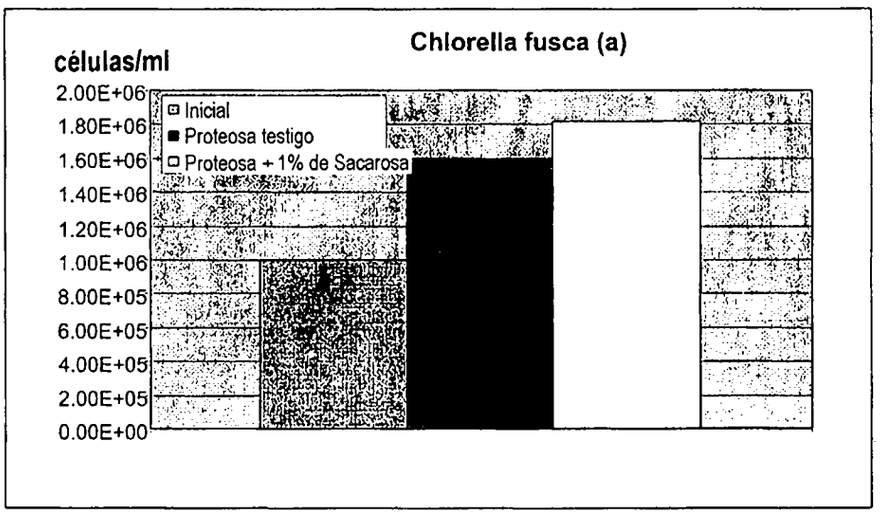

Testigo
Glucosa
Fructosa
1.40E+09
1.20E+09
1.00E+09
8.00E+08
6.00E+08
4.00E+08
2.00E+08
0.00E+00
Densidad celular (células/ml)
C. protothecoides #1
C. protothecoides #3
C. protothecoides #4

Figura 21


Chlorella fusca (a)
células/ml
2.00E+06
1.80E+06
1.60E+06
1.40E+06
1.20E+06
1.00E+06
8.00E+05
6.00E+05
4.00E+05
2.00E+05
0.00E+00
Inicial
Proteosa testigo
Proteosa + 1% de Sacarosa

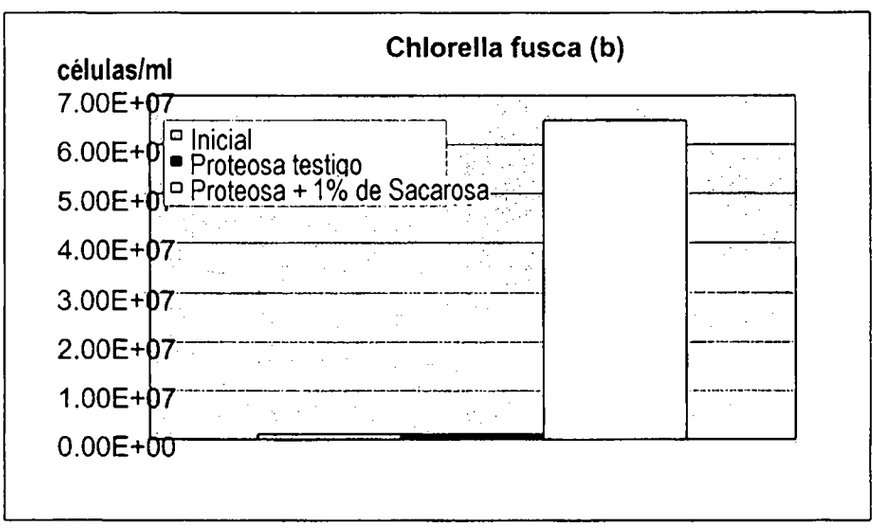
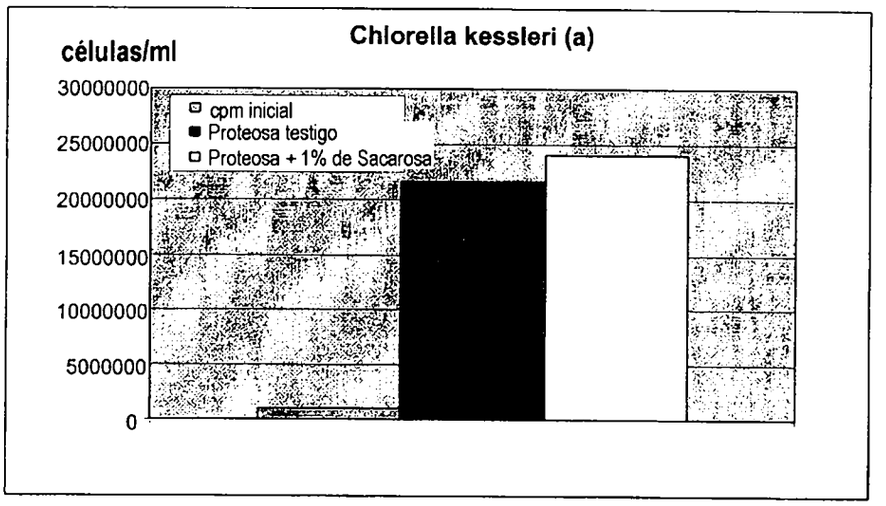
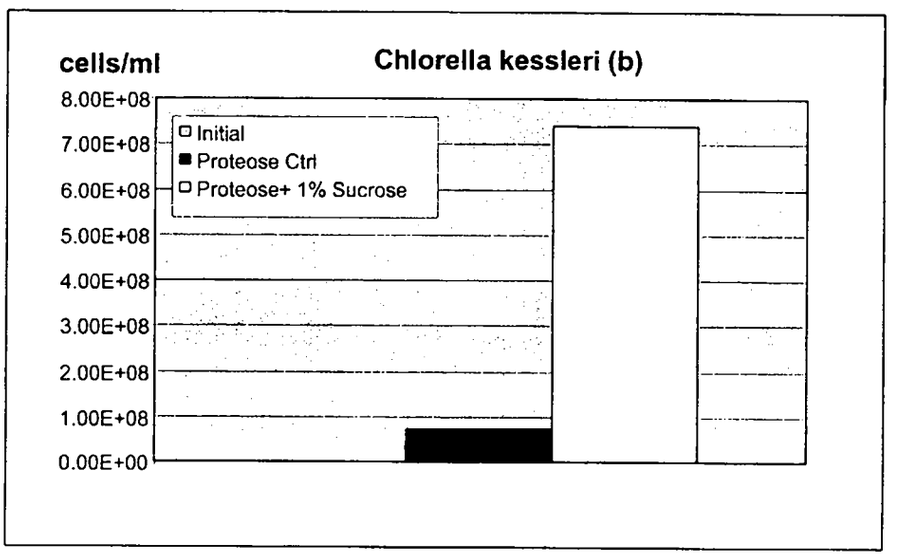

Chlorella fusca (b)
células/ml
7.00E+07
6.00E+07
5.00E+07
4.00E+07
3.00E+07
2.00E+07
1.00E+07
0.00E+00
Inicial
Proteosa testigo
Proteosa + 1% de Sacarosa

Figura 22


Chlorella kessleri (a)
células/ml
30000000
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
cpm inicial
Proteosa testigo
Proteosa + 1% de Sacarosa


Chlorella kessleri (b)
cells/ml
8.00E+08
7.00E+08
6.00E+08
5.00E+08
4.00E+08
3.00E+08
2.00E+08
1.00E+08
0.00E+00
Initial
Proteose Ctrl
Proteose+ 1% Sucrose

433

Figura 23

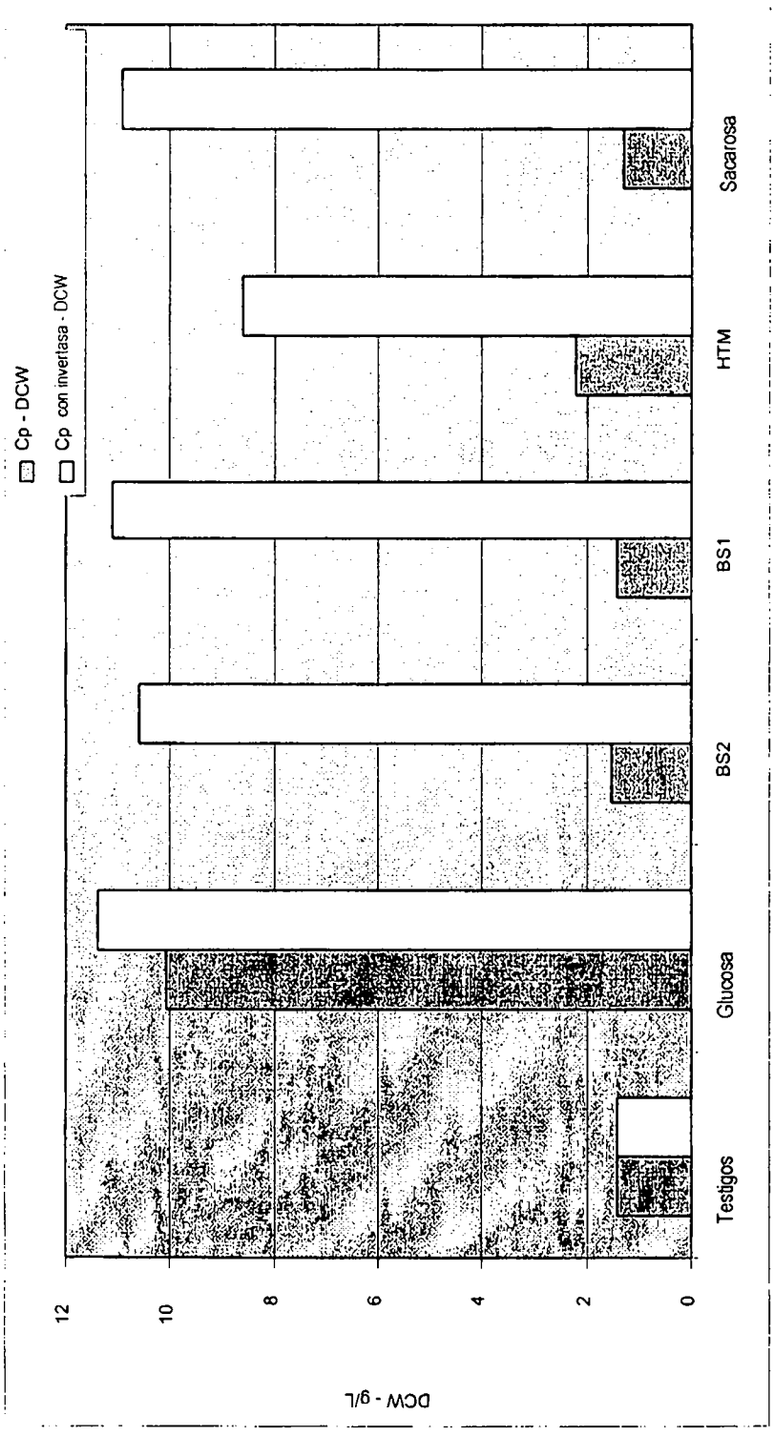


Figura 24

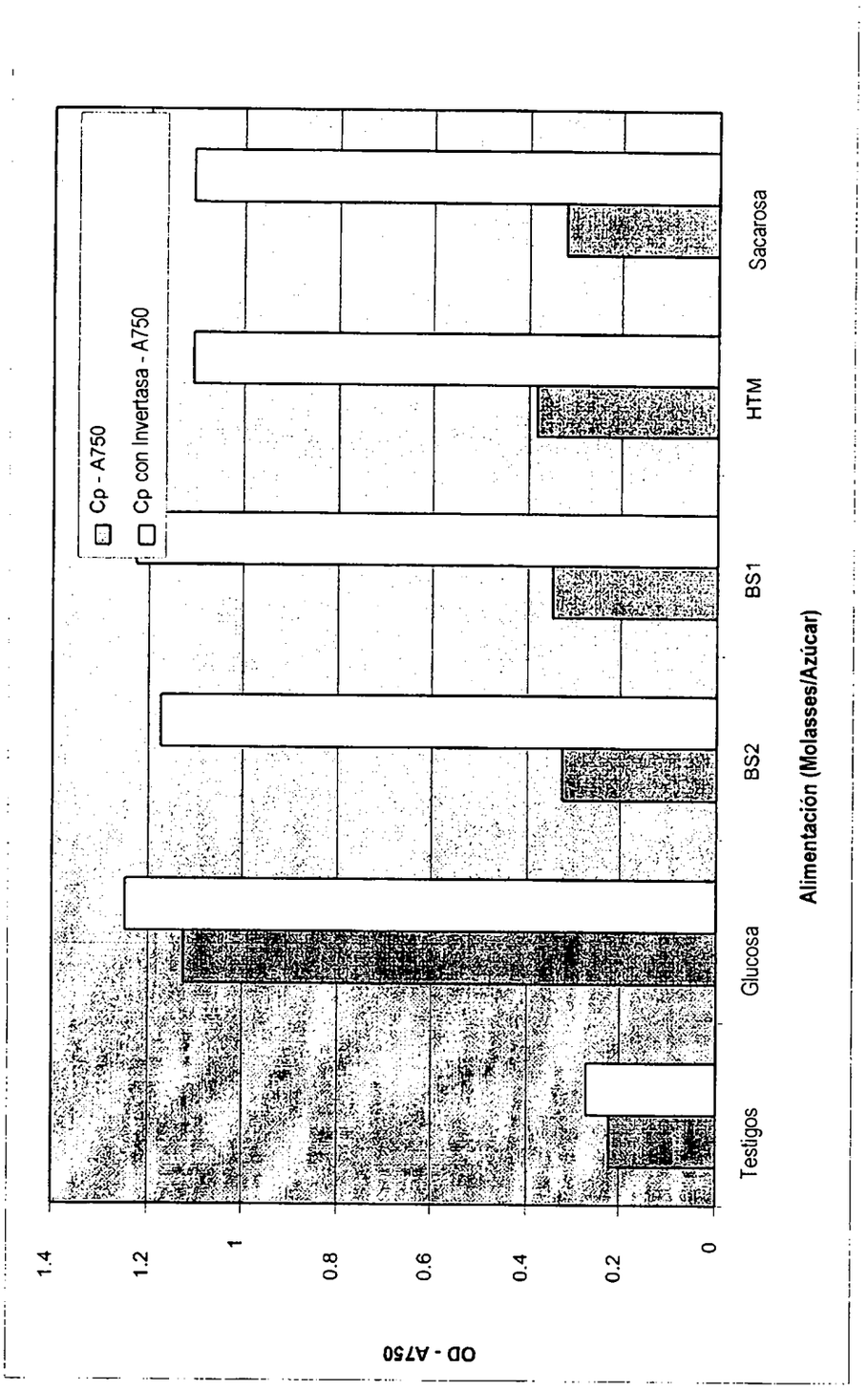

Cp - A750
Cp con Invertasa - A750
OD - A750
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Testigos
Glucosa
BS2
BS1
HTM
Sacarosa
Alimentación (Molasses/Azúcar)

Figura 25

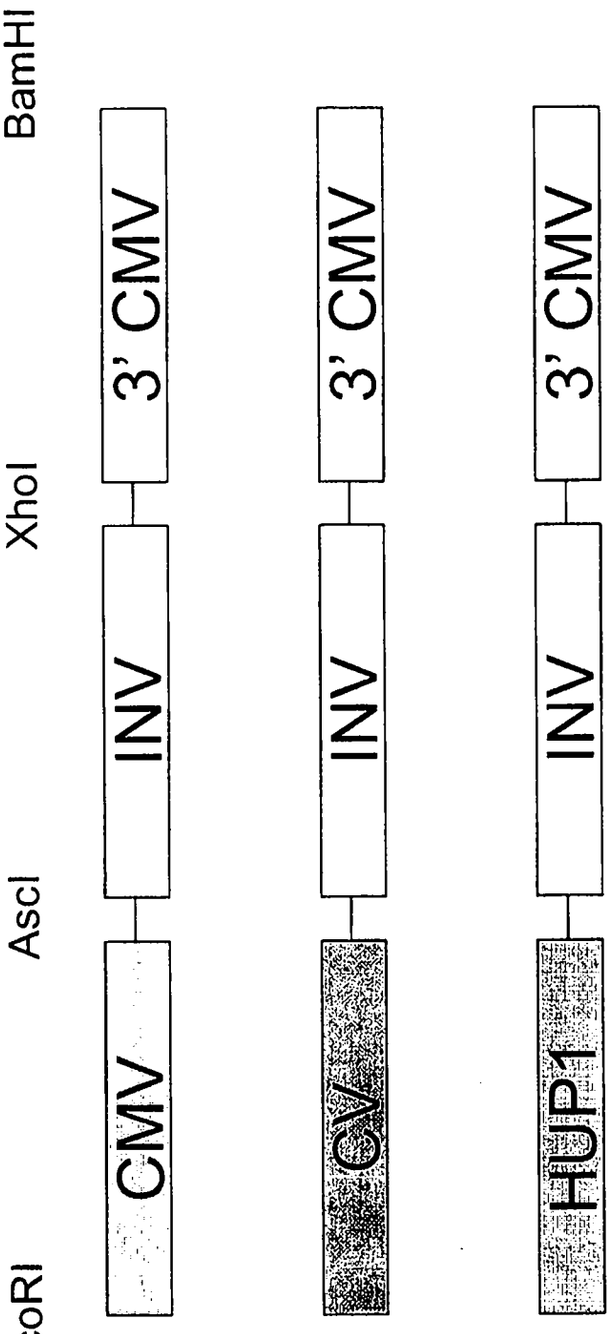


Figura 26

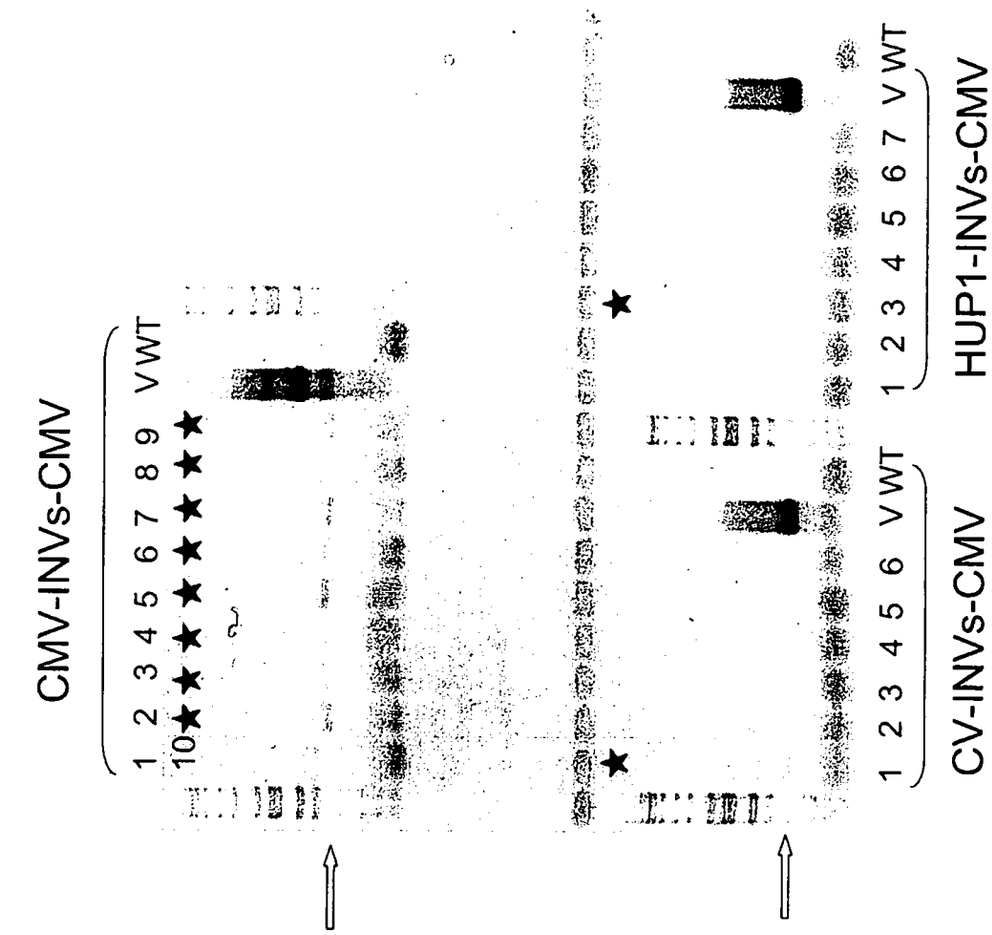
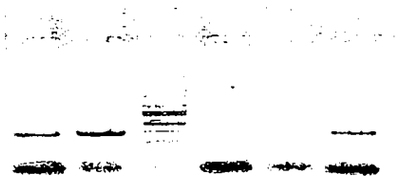

CMV-INVs-CMV
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 V WT
1 2 3 4 5 6 V WT
CV-INVs-CMV
1 2 3 4 5 6 7 V WT
HUP1-INVs-CMV

Figura 27



a b c d e

a -Plásmido (200 pg/ uL)
b -Plásmido (200 ng/ uL)
c -ADN tipo silvestre
d - Transformante #1
e - Transformante #2

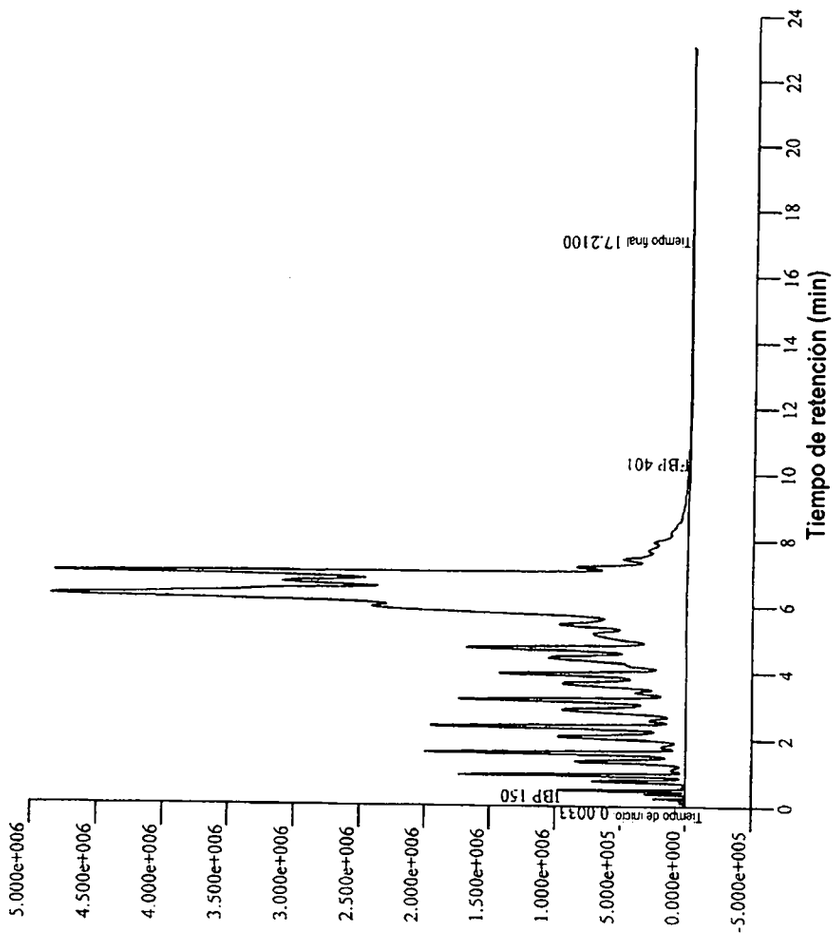
Figura 28



a. Tamaño convencional de ADN en kilobases pareadas
b. Cebador testigo serie 2 (sin marcaje)
c. Cebador testigo serie 4 (sin marcaje)
d. 1 picograma testigo de plásmido, cebador serie 2
e. 1 picograma testigo de plásmido, cebador serie 4
f. Transformante #1 de Chlorella minutissima, cebador serie 2
g. Transformante #1 de Chlorella minutissima, cebador serie 4
h. Transformante #2 de Chlorella minutissima, cebador serie 2
i. Transformante #2 de Chlorella minutissima. cebador serie 4
j. Transformante #1 de Chlorella emersonii, cebador serie 2
k. Transformante #1 de Chlorella emersonii, cebador serie 4
l. Transformante #2 de Chlorella emersonii, cebador serie 2
m. Transformante #2 de Chlorella emersonii, cebador serie 4
n. Chlorella minutissima de tipo silvestre, cebador serie 2
o. Chlorella minutissima de tipo silvestre, cebador serie 4
p. Chlorella emersonii de tipo silvestre, cebador serie 2
q. Chlorella emersonii de tipo silvestre, cebador serie 4

435

Figura 29


5.000e+006
4.500e+006
4.000e+006
3.500e+006
3.000e+006
2.500e+006
2.000e+006
1.500e+006
1.000e+006
5.000e+005
0.000e+000
-5.000e+005
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Tiempo de retención (min)
JBP 150
Tiempo de inicio 0.0033
FBP 401
Tiempo final 17.2100

436

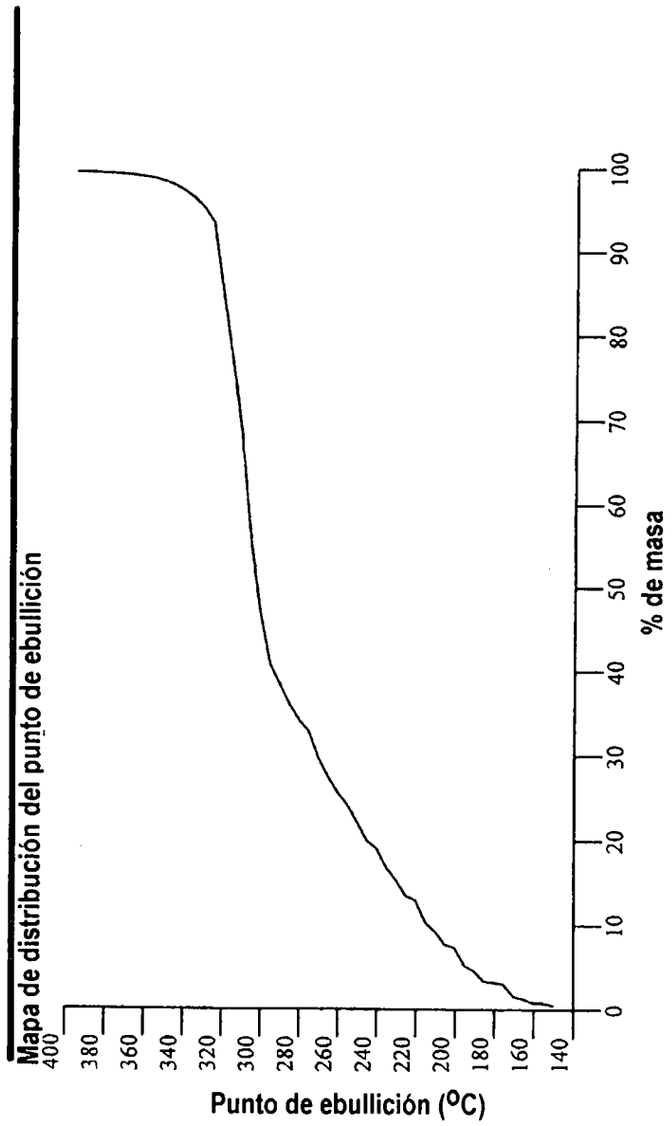


Figura 30

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-149183- -00000-0000

Fecha 2009-12-30 15:26:24 Dep 2020 DIR NUEVAS CR
Tra 11 PATENTES Y I Eve 378 FASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios 436

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que p[illegible] solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☑ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	9 149183
	Solicitud internacional	PCT/US2008/065563
	Fecha inicio fase nacional	01/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2593

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal

Continua en la página siguiente...

Radicación No.:9 149183

e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 26 FEB. 2010
adpa11