

Doctor

José Luis Salazar

Jefe de División de Nuevas Creaci

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRI

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-134253- -00009-0000

Fecha: 2013-08-22 16:26:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 25

Referencia: Expediente No. 10.134.253

Solicitud de Patente de Invención titulada: "Un método para modificar químicamente un lípido de microalga, un método para elaborar un jabón y una composición de lípidos de microalga saponificados"

Solicitante: Solazyme, Inc.

RESPUESTA AL AUTO NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA
DEL 28 DE MAYO DE 2013, OFICIO NO. 9161 (EXAMEN DE FONDO)

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

1. Objeciones del Examinador

1.1 Título

Manifiesta su Despacho que el título no corresponde con el objeto de la solicitud porque la solicitud incluye no sólo la modificación química de lípidos microbianos, sino el método de saponificación para fabricar jabón y las composiciones del método, por lo cual se sugiere al solicitante hacer la corrección necesaria.



1.2 Descripción

Considera su Despacho que la descripción traducida no contiene toda la información de la descripción divulgada en la solicitud internacional. Falta la traducción de la sección "4. *Advantages of Biomass with Higher Saturated Oil Content and Fewer Colored Impurities*, y la sección VI. *Compositions*".

Dado que esta solicitud se refiere a secuencias de nucleótidos o aminoácidos, deben presentarse las listas en forma separada de la descripción, bajo el título: "Listado de secuencias" y anexarlas en formato digital.

1.3 Reivindicaciones

En cuanto a las reivindicaciones su Despacho considera que:

1.3.1. No es clara la palabra "microbios", se sugiere reemplazarla por microorganismos (Reivindicaciones 1, 5, 6).

1.3.2. Las reivindicaciones 1, 7 y 15 son muy generales. Se le recuerda al solicitante que la reivindicación independiente debe mencionar todas las características esenciales necesarias para definir la invención.

1.3.3. El método de la reivindicación 1 no es claro porque no proporciona el método por el cual se determina en qué momento se cumple la condición de "producir biomasa que comprende al menos 50 o/ó de su peso de lípido microbiano por peso seco de células", ni la metodología por la cual se cultiva la población de microorganismos que no están definidos por su estructura (con indicación del N° SEQ), información indispensable para que una persona normalmente versada en la materia pueda reproducir el método. Se sugiere restringir la solicitud a una razonable generalización del cultivo de microorganismos y reacciones químicas que modifican los lípidos covalentemente, de acuerdo a los cultivos y reacciones químicas que se encuentran debidamente sustentados, la reacción química de la transesterificación se encuentra sustentada en la descripción.

1.3.4. El método de la reivindicación 7 no es claro al no definir el método para proporcionar lípido de microalga que cumpla la condición de "no tener más de 500 ppm de impurezas que generan color", adicionalmente no se define las características estructurales de la microalga y las características del método de saponificación del lípido, información indispensable para que una persona normalmente versada en la materia pueda reproducir el método.

1.3.5. La reivindicación 10 no es clara porque pretende caracterizar los microorganismos por su secuencia de ARNr 23S, si bien dicha secuencia es conocida en el estado de la técnica como un caracterizador para bacterias, se recuerda al solicitante que en el ámbito de las patentes la identificación de microorganismo debe hacerse por medio de su número de depósito, con el fin de que se encuentre disponible el material para aquellos que lo requieran. Por otra parte la reivindicación hace referencia a porcentajes de homología, se recuerda al solicitante que cualquiera de las macromoléculas mencionadas debe ser caracterizada por su secuencia completa, la cual además debe ser adjuntada en un listado aparte con su respectivo SEQ ID NO, y que no se aceptan definiciones indicando porcentajes de homología o identidad, puesto que esta definición no permite establecer la secuencia nucleótida exacta a la que se refiere.

1.3.6. Las reivindicaciones 14-20 son reivindicaciones de producto, y sólo pueden ser definidas en términos de su proceso de fabricación si: el producto es nuevo e inventivo y no se puede definir por sus características estructurales. Se sugiere definido por sus características esenciales, estructurales o funcionales. El producto definido como un jabón, está divulgado en la descripción como una composición, se sugiere cambiar el jabón por composición en las reivindicaciones.

1.3.7. Las reivindicaciones 13-14 definen un producto (jabón) pero está encabezadas como un método. Los procedimientos no deben estar definidos en términos de un producto. Se requiere al solicitante que encabece la reivindicación como composición de jabón, definiendo claramente los ingredientes y las proporciones concretas.

1.3.8. Las reivindicaciones 7- 13 mencionan un procedimiento para obtener un producto. El procedimiento debe estar definido por sus etapas y no por las características del producto a obtener.

1.3.9. El término: "al menos" de las reivindicaciones 9, 11, 12, 13, 17, 18, 20, no es conciso, lo cual dificulta determinar la extensión del objeto que se busca proteger.

1.3.10. Las reivindicaciones 7-20 no son concisas, porque presentan una excesiva complejidad, lo cual dificulta determinar la extensión del objeto que se busca proteger. Se sugiere restringir la solicitud a los jabones que están sustentados en la descripción, de acuerdo a los lípidos de microalga que fueron extraídos, a los aceites saponificados y a las modalidades de composición del jabón (Reivindicaciones 18-20).

1.4. Unidad de invención

La solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención porque se refiere a 3, grupos inventivos que requieren búsquedas por separado, el método de modificación química de lípidos no es un elemento común para reclamar el jabón y el método para fabricar el jabón (Documentos D1-D2). En el caso del grupo 2 y 3, el producto reclamado puede obtenerse por un proceso diferente al proceso del grupo 2.

Los grupos inventivos están definidos por las siguientes características esenciales:

1° Método para modificar químicamente lípidos microbianos (Reivindicaciones 1-6). D1

2° Método para fabricar jabón (Reivindicaciones 7-13). D2

3° Jabón (Reivindicaciones 14-20). US 6,589.923

Se sugiere presentar las solicitudes divisionales que considere necesarias, o limitar la solicitud inicial a una sola invención, eliminando de ella las otras invenciones.

1.5. Novedad

El Examinador plantea que, después de realizada la búsqueda de anterioridades, encontró documentos que afectan la novedad de las reivindicaciones 1 - 6 de la presente solicitud.

Particularmente, el Examinador considera que los documentos Xu, et al, 2006. Journal of Biotechnology. VoL 124. Pages: 499-507 (D1) y Cartens, et al, 1996, Journal of the

American Oil Chemists' Society. Vol. 73: 8, Págs. 1025-1031 (D2) afectan la novedad de la presente solicitud por cuanto:

“Las características esenciales del método de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento D1 da a conocer un método de modificación química de lípidos microbianos que comprende el cultivo de microalgas en condiciones heterotróficas, en donde la reacción química que modifica el lípido es la transesterificación.

En consecuencia, la reivindicación 1 no es nueva o carece de novedad, según lo divulgado en el documento D1.

Las reivindicaciones dependientes 2 - 6 no mencionan alguna característica que haga nueva a la composición de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no son nuevas.

(...) Las características esenciales del método de la reivindicación 7 habían sido divulgadas previamente en el documento D2 que da a conocer un método para fabricar jabón que incluye la extracción de lípidos de microalga y la saponificación del lípido (Pág. 1026).

En consecuencia, la reivindicación 7 no es nueva o carece de novedad, según lo divulgado en el documento D2.

Las reivindicaciones dependientes 8 - 13 no mencionan alguna característica que haga nueva a la composición de la reivindicación 7, por lo cual se considera que no son nuevas.”

2. Argumentos a favor de la patentabilidad de la solicitud

2.1 Reivindicaciones

En respuesta a las observaciones planteadas con relación a las reivindicaciones el solicitante presente un nuevo capítulo reivindicatorio el cual ha tenido en cuenta todas y cada una de las observaciones hechas por su Despacho. Las modificaciones hechas no amplían la invención reivindicada.

Aunque el solicitante ha corregido las reivindicaciones, estas correcciones no deben ser consideradas como una aceptación a la posición tomada por el examinador con relación al alcance de la invención de las reivindicaciones originalmente presentadas. En su lugar, el solicitante ha corregido las reivindicaciones para definir más específicamente la invención reivindicada y continuar con el trámite de la solicitud.



2.1.1. Por favor note que el término "microbio" y "microbiano" se han reemplazado por "microalga(s)" y "de microalga(s)"

2.1.2. El solicitante considera que todas las características esenciales de la invención se divulgan en las reivindicaciones independientes.

2.1.3. La referencia a una cantidad particular de lípido se ha suprimido de las reivindicaciones. El solicitante considera que la metodología para cultivar microalgas será familiar para la persona medianamente versada en la materia en vista de la especificación (por ejemplo párrafos 135 a 155) y la técnica. Las reivindicaciones se han corregido para citar géneros particulares de microalgas (*Chlorella* y *Prototheca*) que se ejemplifican en la solicitud (ver, por ejemplo, ejemplo 25 y 27 - 29, que muestran microalgas con impurezas de color reducido), y reacciones químicas que se discuten de manera explícita (ver, por ejemplo, párrafos 111 a 114 y 236 a 261). Así, el solicitante considera que la materia objeto reivindicada es clara para la persona medianamente versada en la materia.

2.1.4. La reivindicación 7 se ha corregido para citar que el lípido de microalga se obtiene de microalgas del género *Prototheca* y del género *Chlorella*. Los ejemplos 27 y 29 identifican células de *Chlorella* y *Prototheca* como fuentes de lípido de microalga con pocas impurezas que generen color. Las características de saponificación de los lípidos serán familiares para la persona medianamente versada en la materia en vista de la especificación (ver, por ejemplo, párrafos 248 - 260) y la técnica. Por lo tanto, el solicitante considera que la materia objeto reivindicada será clara para la persona versada en la materia.

2.1.5. Sin estar de acuerdo con la observación de su Despacho la reivindicación 10 se ha cancelado respondiendo de esta manera a la objeción.

2.1.6. Los productos de las reivindicaciones 11-13, 14, 15, 16 y 17 se definen por las características de la composición en lugar del proceso mediante el cual se hacen. Tal como lo sugiere su Despacho, estas reivindicaciones citan una composición en lugar de un jabón.

2.1.7. Sin estar de acuerdo con su Despacho, se han cancelado las

reivindicaciones 13 y 14 originales.

2.1.8. De las reivindicaciones 7 a 13 solo permanecen las reivindicaciones 7 y 8. Sin estar de acuerdo con su Despacho se han cancelado las reivindicaciones 9 a 13. Cada una de las reivindicaciones 7, 8, 9 y 10 citan un proceso en lugar de las características del producto a obtener.

2.1.9. El término "al menos" se ha suprimido de las reivindicaciones corregidas.

2.1.10. Por favor note que las reivindicaciones corregidas son concisas y lo que se consideraba como una excesiva complejidad ya no esta presente en el nuevo capítulo reivindicatorio.

2.2. Título

En relación con el título el solicitante ha modificado el título por:

"Un método para modificar químicamente un lípido de microalga, un método para elaborar un jabón y una composición de lípidos de microalga saponificados".

2.3. Unidad de invención

Su Despacho plantea que la presente invención posee tres diferentes grupos inventivos.

Sin estar de acuerdo con esta observación, el solicitante ha corregido las reivindicaciones para citar un método para modificar químicamente el lípido de microalgas, un método de elaboración de jabón por vía de la saponificación del lípido de microalgas, en donde el lípido de microalgas y/o la biomasa comprenden no más de 500 ppm de impurezas que generan color (carotenoides y/o clorofila).

De acuerdo con la regla 13.1 del PCT se requiere que la solicitud se relacione con una invención o grupo de invenciones ligadas formando un único concepto inventivo. Se considera que se cumple con este requisito cuando un grupo de invenciones involucra una o más características técnicas especiales que definan una contribución al estado de la técnica.

PCT regla 13.2.

La materia objeto reivindicada se unifica mediante una característica técnica especial

Cada una de las reivindicaciones independientes del capítulo reivindicatorio corregido citan lípido de microalgas y/o biomasa que comprende no más de 500 ppm de impurezas que generan color. Las referencias citadas por su Despacho (D1: Xu, et al, 2006. Journal of Biotechnology. 126:499-507 (2006) y D2: Cartens, et al., 1996, Journal of the American Oil Chemists' Society. Vol. 73: 8, Págs. 1025-1031 (1996) no enseñan ni al menos sugieren esta características de la invención actualmente reivindicada. En su lugar, las referencias citadas discuten el cultivo de *Chlorella Protothecoides* y *Phaeodactylum Tricornutum*, respectivamente, sin referencia a cantidades específicas de impurezas que generan color.

Aunque D1 menciona que las células de *C. Protothecoides* cultivadas heterotróficamente eran de color amarillo en lugar de verde y contenían más pocos componentes de clorofila y carotenoides (ver párrafos numerados 3.3. en las páginas 503 a 504, y la figura 3), no se discute ninguna cuantificación específica. Sin embargo, Shi et al., Biotechnol. Prog., 18:723-727 (2002) (copia anexa), reporta que las células de *C. Protothecoides* heterotróficamente cultivada comprende de 4,65 a 5,35 mg/g de luteína (4650 a 5350 ppm) (ver Tabla 1 en la página 725). La luteína esta entre las impurezas de carotenoides que generan color identificadas en la especificación en el párrafo 270. Así, aún esta impureza que genera color esta presente de acuerdo con los reportes en las células de *C. Protothecoides* cultivadas heterotróficamente a una concentración de más de 10 veces la citada en la presente invención.

De manera similar, D2 discute la extracción de ácido graso proveniente de la biomasa de la microalga marina *P. tricornutum* con etanol (96%) KOH (ver p. 1026, primeros dos párrafos de los "Procedimientos Experimental"). Aunque D2 no discute sobre las células de *Chlorella* o *Prototheca*, tal como se reivindicaron y no hace ninguna referencia a las impurezas que general color, el solicitante hace notar que Gonzales et al. JAOCS. 75(12): 1735-1740 (1998) (copia anexa), reporta que un extracto crudo de ácido graso de biomasa de *P. Tricornutum* con etanol (96%)/KOH incluyó pigmentos tales como carotenoides y clorofilas, y que las clorofilas solas comprendían 1% de la biomasa en peso (10000 ppm) (ver p. 1737, párrafo que une las dos columnas). Así, las células de *P. Tricornutum*

contenían clorofila a una concentración de 20 veces la reportada en la invención actualmente reivindicada.

En vista de lo anterior, el solicitante considera que la materia objeto reivindicada comparte una relación técnica que involucra al menos una característica técnica especial (es decir, menor de 500 ppm de impurezas que generan color) que definen una contribución sobre el estado de la técnica y cumplen con el requisito de unidad de invención, tal como lo exige la Regla 13 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes.

2.4. Novedad

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

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

Como se discutió anteriormente, ni D1 ni D2 enseñan ni sugieren el uso de biomasa de microalgas o lípido que comprenda no más de 500 ppm de impurezas que generen color. Esta característica distingue la invención reivindicada de la técnica anterior citada.

Más aún, tal como se discutió en la especificación, el efecto técnico de utilizar biomasa de microalgas que no contienen más de 500 ppm de impurezas que generen color es que las composiciones y los productos producidos contienen una correspondiente cantidad baja y reproducible de impurezas que generan color. El párrafo 267 de la solicitud explica que una ventaja de utilizar biomasa con más pocas impurezas es la mejora de las cualidades estéticas de composiciones de aceite y jabones en los cuales se incorpora el lípido de microalgas y/o la biomasa. La ausencia relativa de impurezas de color también mejora la satisfacción del cliente, particularmente sobre la vida extendida en extante, en razón a que las impurezas de color tienden a cambiar la apariencia de la composición de aceite durante el tiempo debido a



la oxidación.

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

A manera informativa, pongo en conocimiento del Examinador que las patentes estadounidenses 8,119,583; 8,278,261 y 8,450,083, Mejicana 305650 y neozelandesa 588586, equivalentes a la presente solicitud colombiana ha sido otorgadas. Aún cuando entiendo que estas decisiones de ninguna manera obligan al Despacho para decidir de igual forma, considero que por tratarse de una pregunta fáctica la determinación de la existencia de novedad y nivel inventivo, las decisiones de otras oficinas de patentes constituyen un antecedente persuasivo en la materia.

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

Atentamente,

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

- Anexos:
- Capítulo descriptivo completo (incluida la parte faltante) en formato digital
 - Capítulo reivindicatorio modificado
 - Copia del documento de Shi et al., Biotechnol. Prog., 18:723-727 (2002)
 - Copia del documento de Gonzales et al. JAOCS. 75(12): 1735-1740 (1998)
 - Listado de Secuencias en formato digital

CAPITULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

Exp. 10.134.253

1. Un método para modificar químicamente lípidos de microalgas que comprende:
 - (a) cultivar una población de microalgas del género *Prototheca* o del género *Chlorella* bajo condiciones heterotróficas para producir biomasa que comprende de lípido de microalgas y no mas 500 ppm de impurezas que generan color, en donde las impurezas que generan color son carotenoides y/o clorofila; y;
 - (b) someter el lípido a una reacción química que modifica covalentemente el lípido, donde la reacción química comprende transesterificación, interesterificación, hidroxilación, ciclopropanación, epoxidación, hidroprocesamiento, desoxigenación, isomerización, hidrogenación, saponificación o hidrólisis.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido de microalgas se extrae de la biomasa antes de ser sometido a la reacción química.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido de microalgas se somete a la reacción química en la biomasa.
4. El método de la reivindicación 3, en donde las células de la biomasa son lisadas antes de someter el lípido de microalgas a la reacción química.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las microalgas son unas especies seleccionadas del grupo que consiste de *Prototheca Stagnora*, *Prototheca Portoricensis*, *Prototheca Moriformis* y *Prototheca Zopfii*.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las microalgas son unas especies seleccionadas del grupo que consiste de *Chlorella fusca*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella ellipsoidea*.
7. Un método para fabricar jabón, que comprende:
- (a) proporcionar lípido de microalga que comprende no más de 500 ppm de impurezas que generan color, en donde el lípido de microalgas se obtiene de microalgas del género *Prototheca* o del género *Chlorella*, y las impurezas que generan color son carotenoides y/o clorofila; y
 - (b) saponificar el lípido de microalgas para producir un jabón.
8. Un método para hacer un jabón, que comprende saponificar la biomasa de microalga que comprende lípido de microalga y no más de 500 ppm de impurezas que generan color, en donde la biomasa de microalgas comprende células del género *Prototheca* o del género *Chlorella* y las impurezas que generan color son carotenoides y/o clorofila, y en donde la saponificación se efectúa al poner en contacto la biomasa de microalga con una solución acuosa que contiene una base para formar sales de ácidos graso, donde el jabón comprende sales de ácido graso.
9. El método de la reivindicación 7 o reivindicación 8, en donde las microalgas son especies seleccionadas del grupo que consiste de *Prototheca Wickerhamii*, *Prototheca Stagnora*, *Prototheca Portoricensis*, *Prototheca Moriformis* y *Prototheca Zopfii*.
10. El método de la reivindicación 7 o reivindicación 8, en donde las microalgas son especies seleccionadas del grupo que consiste de *Chlorella Fusca*, *Chlorella*

Protothecoides, Chlorella Pyrenoidosa, Chlorella Kessleri, Chlorella Vulgaris, Chlorella Saccharophila, Chlorella Sorokiniana y Chlorella Ellipsoidea.

11. Una composición que comprende sales de ácidos grasos de lípido de microalga saponificado que comprende no más de 500 ppm de impurezas que generan color, en donde las impurezas que generan color son carotenoides y/o clorofila.
12. La composición de la reivindicación 11 que comprende biomasa de células de microalga, además del lípido de microalga saponificado.
13. La composición de la reivindicación 12, donde la biomasa de célula de microalga comprende menos de 0,01 mg / kg de clorofila.
14. La composición de la reivindicación 12 o reivindicación 13, en donde la biomasa de célula de microalga comprende células de microalga del género *Prototheca* o del género *Chlorella*.
15. La composición de la reivindicación 14, en donde las células de microalga son unas especies seleccionadas del grupo que consiste de *Prototheca Wickerhamii*, *Prototheca Stagnora*, *Prototheca Portoricensis*, *Prototheca Moriformis* y *Prototheca Zopfii*.
16. La composición de la reivindicación 14, en donde las células de microalga son unas especies seleccionadas del grupo que consiste de *Chlorella Fusca*, *Chlorella Protothecoides*, *Chlorella Pyrenoidosa*, *Chlorella Kessleri*, *Chlorella Vulgaris*, *Chlorella Saccharophila*, *Chlorella Sorokiniana* y *Chlorella Ellipsoidea*.

17. La composición de la reivindicación 11 que además comprende sales de ácidos grasos de al menos un aceite saponificado seleccionado del grupo que consiste de aceite de palma, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de cacao, grasa de pollo, sebo de res, sebo porcino, aceite de soja, aceite de colza, aceite de canola, aceite de palmiste, aceite de maíz, aceite vegetal de desperdicio, cebo chino, aceite de girasol, aceite de semilla de algodón, aceite de microalgas, aceite de macroalgas, aceite de Cuphea, aceite de lino, aceite de maní, grasa blanca de calidad, manteca de cerdo, aceite de *Camelina sativa*, aceite de semilla de mostaza, aceite de marañón, aceite de avena, aceite de lupino, aceite de kenaf, aceite de caléndula, aceite de cáñamo, aceite de café, aceite de semillas de lino (lino), aceite de avellana, aceite de euphorbia, aceite de semilla de calabaza, aceite de cilantro, aceite de camelia, aceite de ajonjolí, aceite de cártamo, aceite de arroz, aceite de árbol de tung, aceite de copra, aceite de adormidera, aceite de semillas de ricino, aceite de pecana, aceite de jojoba, aceite de jatropha, aceite de macadamia, aceite de nueces del Brasil, aceite de aguacate, y aceite de fósil o una fracción destilada del mismo.

Optimization of Fatty Acid Extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 Biomass

M.J. Ibáñez González^a, A. Robles Medina^{a,*}, E. Molina Grima^a,
A. Giménez Giménez^a, M. Carstens^b, and L. Esteban Cerdán^a

^aDepartamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería, E-04071 Almería, Spain, and ^bDepartamento de Ingeniería Química, Universidad de la Patagonia, Comodoro Rivadavia, Argentina

ABSTRACT: Fatty acids in the microalga *Phaeodactylum tricornutum* were isolated using an optimized three-step method: extraction of crude fatty acid potassium salts made by direct saponification of lipids in the microalgal biomass with KOH/ethanol (96%, vol/vol), separation of unsaponifiable lipids by extraction with hexane, and final purification of fatty acids by acidification of the alcoholic solution of potassium soaps followed by extraction of fatty acid into hexane. Direct saponification was carried out in ethanol (96%, vol/vol) using 2.09 mL ethanol (96%) per gram of wet biomass (10 mL/g of dry biomass) mixed with 0.4 g KOH/g of biomass. Under these conditions the fatty acid yield was 87%. The optimal water content of the alcoholic solution for extraction of the unsaponifiables was established as 40%, w/w. Data on equilibrium carotenoid distribution between the alcoholic (40%, w/w water) and hexane phases were determined. These data allow prediction of the carotenoid yields with different volumes of hexane in several extraction steps. The optimal pH of the alcoholic solution before extracting the purified fatty acid was established as pH 6, and the equilibrium fatty acid distribution between the alcoholic and hexane phases was determined. This optimized method permitted a 20% reduction in the production costs of highly purified eicosapentaenoic acid (EPA) in the three-step preparative process (extraction of fatty acid, concentration of polyunsaturated fatty acids by the urea method, and EPA fractionation through preparative high-performance liquid chromatography) previously developed by the authors. *JAACS* 75, 1735–1740 (1998).

KEY WORDS: Eicosapentaenoic acid (EPA), fatty acid extraction, fatty acid purification, *Phaeodactylum tricornutum*.

Technology has been evaluated for the potential production of polyunsaturated fatty acids (PUFA) by microorganisms (1). Human diets formulated to contain PUFA reportedly produce a preventive/regulatory effect in the treatment of circulatory system diseases (2). Today's technology has made oils from microalgae competitive with those from fish as a source of these raw materials (3). Under certain growth conditions, the microalga *Phaeodactylum tricornutum* has a high rate of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) production. EPA is a fatty acid essential for human metabolism and is involved in

blood lipids equilibrium. EPA lowers triglyceride levels in blood serum, reduces the degree of platelet aggregation, is anti-inflammatory (4), and prevents hypertriglyceridemia (5) and various carcinomas (6). Total *Phaeodactylum tricornutum* fatty acids include 20–40%, w/w, EPA and small amounts of other PUFA that are difficult to separate from EPA during the purification process (7,8).

Current processes cannot provide the highly purified products required by the pharmaceutical industry for preclinical and clinical trials (2). Therefore, further development in this area of microalgal biotechnology will require rapid reliable methods of PUFA extraction and purification from the microalgal biomass. At the same time, such treatments must minimize autooxidative degradation and the presence of artifacts. Furthermore, solvents used to extract PUFA for the pharmacological industry must be selected bearing in mind their toxicity, handling, safety, and cost.

A three-step process for obtaining highly purified PUFA from cod liver oil and microalgae has recently been developed. The three steps are, fatty acid extraction by direct saponification of biomass, enrichments of PUFA by urea fractionation, and isolation of PUFA through preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). In this way, 96%-pure EPA and 95%-pure docosahexaenoic acid (DHA) from the microalga *Isochrysis galbana* (9), 96%-pure EPA from *P. tricornutum* (8,10), and 94%-pure EPA and 81%-pure arachidonic acid (AA) from *Porphyridium cruentum* (11) have been obtained. A preliminary estimate of the cost of obtaining EPA from wet *P. tricornutum* biomass by this procedure puts the production cost of 96%-pure EPA at US\$188 per gram, extraction by direct saponification of biomass and purification through preparative HPLC being the most expensive steps (67% of the total costs) (10). The objective of this work was to reduce extraction costs by optimizing the first step (the extraction of fatty acid from biomass).

MATERIALS AND METHODS

Microalgal biomass. Wet biomass of the marine microalga *P. tricornutum* UTEX 640 was used as an oil-rich substrate with a high proportion of EPA. Cells were grown in an outdoor tubular photobioreactor, harvested by centrifugation at

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: arobles@ualm.es

1800 × g, and then stored at −18°C until use. The wet paste biomass contained $20.9 \pm 1.3\%$ dry biomass. The total fatty acid content in the biomass was $10.9 \pm 0.5\%$ of the dry weight, and the EPA content was 26% of the total fatty acids.

Fatty acid extraction from biomass. Fatty acid extraction was performed by the three-step method shown in Figure 1, that is, direct saponification of wet biomass, followed by extraction of unsaponifiables and extraction of purified fatty acids.

Direct saponification of wet biomass. In a typical experiment 4.8 g of wet biomass (1 g of dry biomass) was treated with 76 mL of ethanol (96%, vol/vol), containing 1.6 g of KOH (85% pure), in a 2.5-L reactor that was jacketed for temperature control. Saponification was carried out at 60°C for 1 h with constant agitation in an argon atmosphere. The mixture obtained was then filtered through a 100–160 µm microporous glass filter, and the biomass residue was washed with 20 mL of ethanol (96%).

Extraction of unsaponifiables. In a typical experiment 20 mL of water was added to 96 mL of the soap solution (11% w/w water and 47 ± 2 mg/L of carotenoids) to obtain a solution with 28% w/w water, and unsaponifiables were extracted in subdued light at 20°C by adding hexane and shaking. The two phases were then separated and two aliquots of each

phase taken for carotenoid determination. To study equilibrium carotenoid distribution between the alcoholic phase and hexane, different volumes of hexane were added to 25 mL of a 40% w/w, water/alcoholic solution (34.0 ± 1.1 mg/L carotenoids). These extractions were carried out at 20 and 40°C. Unsaponifiables were also separated from the soap solution in several extraction steps with different volumes of hexane.

Extraction of purified fatty acids. In a typical experiment the pH of the 40% w/w water/alcoholic solution was adjusted to pH 1.0 using 35% HCl. The fatty acid concentration of this solution was 903 ± 18 mg/L. The equilibrium distribution of fatty acids was determined by adding different volumes of hexane to 25 mL of fatty acid solution. Extractions were performed in subdued light in an argon atmosphere at 20°C with agitation. The phases were separated, and an aliquot of each was taken for fatty acid determination. Extraction of fatty acid was also carried out in several steps with different volumes of hexane (Fig. 1).

Carotenoid determination. Carotenoids were determined as a measure of the unsaponifiable extraction yields using a modified version of the method employed by Whyte (12). To determine carotenoids in the alcoholic solution a known volume of this solution was dried under a N₂ stream. The residue was resuspended in an aqueous solution with 60% KOH, and the carotenoids were extracted with ethyl ether. Then the ethyl ether phase was dried, and carotenoids were resuspended in a known volume of acetone. To determine carotenoids in the hexane phase a known volume of this solution was dried, and the residue was resuspended in a known volume of acetone. The optical densities (OD) of these suspensions were determined at 444 nm using acetone as the reference. Carotenoids concentration (C) was determined by Equation 1:

$$C \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 4.32 \text{ OD} - 0.0439 \quad [1]$$

This equation was obtained using β-carotene as the solute and acetone as the solvent with a correlation coefficient (r^2) of 0.9998. Equation 1 was used to determine carotenoids in the initial alcoholic solution and in hexane upon reaching equilibrium. Carotenoids in the alcoholic phases were determined by difference between the amount of initial carotenoids and the amount in the hexane phase.

Fatty acid determination. Fatty acids in feedstock, hexane, and alcoholic phases were analyzed by capillary gas chromatography (GC). To determine fatty acids in the hexane phase, a known volume was dried in a N₂ stream, and methylation was by direct transesterification following the method of Lepage and Roy (13). Methylation and methyl ester analysis have been described elsewhere (14). To determine fatty acids in the alcoholic phase, a known volume was mixed with an equal volume of water, and HCl was added to pH 1.0; fatty acids were extracted three times with hexane, and the amount in hexane was then analyzed as indicated above. Fatty acid yields were then calculated (14). The total fatty acid content in biomass was determined by direct transesterification of fatty acid in biomass.

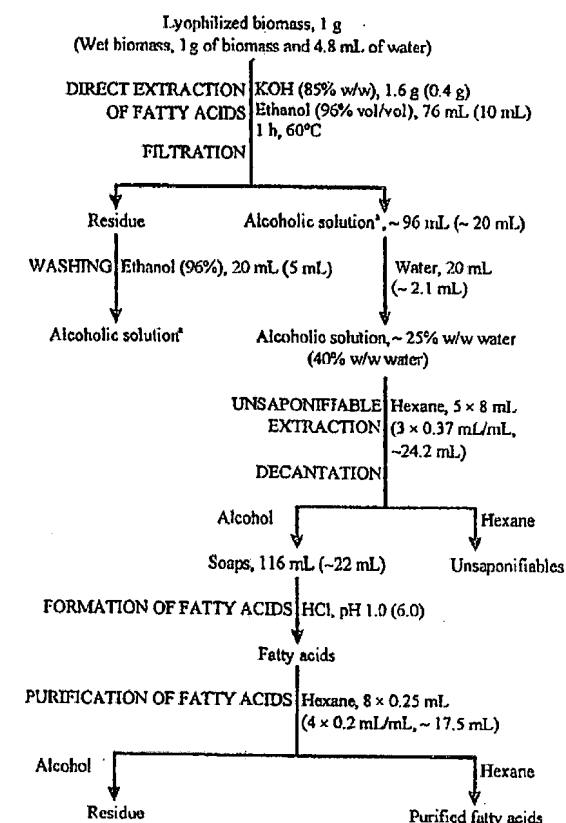


FIG. 1. Original and optimized (in parentheses) process to extract and purify fatty acids from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. (*The two alcoholic solutions are mixed.)

Protein and chlorophyll determination. Proteins were determined in the final alcoholic solution after separating the purified fatty acids, as described by Lowry *et al.* (15). Chlorophylls in the biomass were measured according to the method of Hansmann (16).

RESULTS AND DISCUSSION

Fatty acid extraction from biomass. In earlier work several low-toxicity solvents were evaluated for extracting fatty acids from the microalgae *I. galbana* (14) and *P. tricornutum* (8). The best solvents were ethanol (96% vol/vol) and hexane/ethanol (96%) (1:2.5, vol/vol). However, lyophilized biomass was extracted and large volumes of solvents were used (Fig. 1). Table 1 shows that fatty acid yield decreased about 4% when the ratio of ethanol (96%)/wet biomass decreased from 20 to 1 mL/g, and the ethanol concentration decreased from 92 to 55% (vol/vol), as consequence of water present in the wet biomass. Therefore, an ethanol (96%)/wet biomass ratio of 1.05 mL/g, which is much lower than what was used previously (76 mL/g of lyophilized biomass) (8), seems to be enough. However, 2.09 mL of ethanol (96%) per gram of wet biomass (10 mL/g of dry biomass) was used, because the subsequent filtration took too long with an ethanol (96%)/wet biomass ratio of 1.05 mL/g. The partial yields of EPA were similar to the overall fatty acid yields (Table 1). When the extraction was made from lyophilized biomass a fatty acid yield of 96.2% was obtained (Table 1). The decrease in the fatty acid extraction yield obtained with wet biomass can be compensated by the decrease in cost because the lyophilization is omitted.

Extraction of unsaponifiables. The crude fatty acid extract obtained with ethanol (96%)/KOH (i.e., the initial alcoholic solution in Fig. 1) contains the potassium salts of fatty acids,

pigments such as carotenoids and chlorophylls (the chlorophylls in *P. tricornutum* biomass were about 1% by dry weight), proteins (the protein concentration in the final alcoholic solution was 14.8 g/L) and other lipid and nonlipid contaminants. The unsaponifiable lipids, such as carotenoids, can be extracted by treating the crude extract with apolar solvents such as chloroform or hexane, in which soaps are not soluble. Here hexane was used because it is less toxic than chloroform. The alcoholic solution contained a little water [i.e., only the water added with the wet biomass and ethanol (96% vol/vol)]. An increase in the water content (obtained by adding water to a solution with 11% w/w water and 45 mg/L of unsaponifiables as β -carotene decreased the miscibility of the alcoholic solution and hexane and increased the unsaponifiable extraction yield. At water contents of 11, 30, 40, 50, 60, and 70% w/w, the unsaponifiable extraction yields with respect to the amount of unsaponifiables contained in the alcohol solution were 15.3, 24.6, 37.6, 50.3, 60.1, and 54.6% w/w of β -carotene, respectively (extraction carried out at 20°C and an alcohol solution/hexane ratio 1:1, vol/vol). At water percentages over 60%, emulsions formed, the stability of which increased with water content. Also, when the 50–60% water/alcoholic solutions were later acidified to extract the fatty acids (Fig. 1), emulsions again formed. Emulsions make extraction difficult and decrease the fatty acid recovery. So an optimal water content of 40% was chosen to prevent emulsions formation. In a previous article (8), it was reported that emulsions formed more easily when the biomass residue was not separated from the soap solution by filtration and when this residue was washed with water instead of ethanol. The alcoholic solution contained surfactant agents, such as soaps and proteins, that facilitated and stabilized the alcoholic/hexane emulsion. An increase in the water content increased the amount of hydrating water that stabilized the hydrophilic moieties of the surfactant agents, thus stabilizing the emulsion.

To optimize the hexane/alcoholic solution ratio used for extracting the unsaponifiables, we determined the equilibrium carotenoid distribution between the hexane and alcoholic (40% w/w water) phases and/or the relationship between the extraction yield and the hexane/alcohol ratio (Fig. 2, Table 2). Table 2 shows that the recovery of unsaponifiables with hexane increased with the hexane/alcohol phase ratio. However, a large volume of hexane was required to extract the unsaponifiables quantitatively. The equilibrium distribution constant values (Table 2) and the equilibrium data (Fig. 2) also show that equilibrium was greatly displaced to the alcoholic phase and that when the temperature was increased from 20 to 40°C, the equilibrium was only slightly displaced to the hexane phase. The equilibrium data enable prediction of the unsaponifiable yield when the extraction is done in one or several steps with different volumes of hexane. Table 3 compares the extraction yields obtained experimentally (by a five-step hexane extraction) and those obtained from the equilibrium data. The calculation of the latter is based on a sequence of five batch extraction steps, typical in the chemical process industry, assuming that equilibrium has been attained in each

TABLE 1
Influence of Ethanol (96%)/Wet Biomass (20.9 ± 1.3% dry biomass) Ratio on the Fatty Acid Yield Obtained by Direct Saponification of Wet *Phaeodactylum tricornutum* Biomass

Ethanol (96%)/ wet biomass (mL/g)	Ethanol (96%)/ dry biomass (mL/g)	Ethanol ^a (%) (vol/vol)	Fatty acid yield ^b (%)	EPA yield (%)
1.05	5	55	86.0	86.0
2.09	10	70	87.0	90.2
2.93	14	76	86.3	89.7
3.97	19	80	86.9	88.5
7.94	38	87	88.5	89.2
11.91	57	90	90.6	90.9
18.88	76	92	90.4	92.1
19.86	95	92	90.0	92.2
—	76 ^c	96	96.2 ^d	98.3 ^d

^aThe concentration of ethanol diminishes as a result of the water contained in the wet biomass.
^bFatty acids were extracted by four aliquots of 0.2 mL hexane per mL of alcohol solution at 20°C. Percentage of fatty acid extracted with respect to the total amount of fatty acids contained in the initial biomass.
^cEthanol/dry biomass ratio corresponds to the usual solvent/biomass ratio used by the method of Bligh and Dyer (Ref. 18).
^dThese yields were obtained using lyophilized biomass.

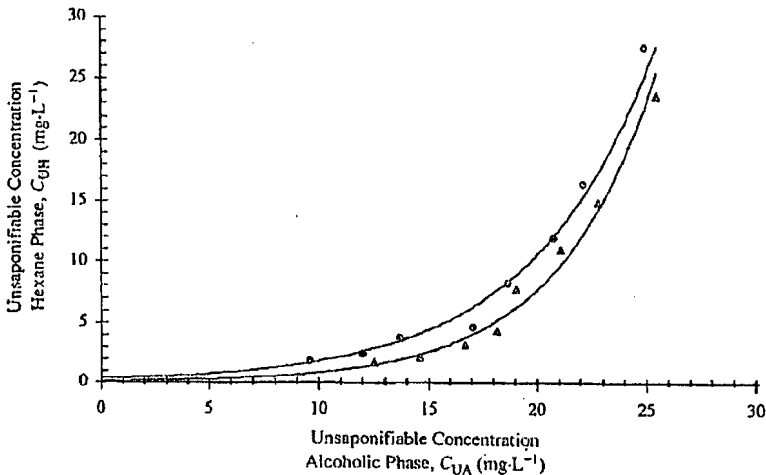


FIG. 2. Equilibrium distribution of unsaponifiables between the alcoholic (40% w/w water) phase and hexane at 20 (Δ) and 40°C (●). The experimental data were fit by the equations $C_{UH} = 0.10 \exp (0.217 C_{UA})$ at 20°C and $C_{UH} = 0.32 \exp (0.175 C_{UA})$ at 40°C. The correlation coefficients (r^2) were 0.9757 and 0.9797, respectively. C_{UH} is the concentration of unsaponifiables in the hexane phase ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and C_{UA} is the concentration of unsaponifiables in the alcoholic phase. The mean deviations between the experimental C_{UH} and the values predicted by the equations are 12.5 and 9.5% of the experimental C_{UH} at 20 and 40°C, respectively.

step and further that the two phases are totally immiscible (17). Good correlation is observed (less than 10% difference). Table 3 shows that maximal unsaponifiable yields of 48.7% were obtained with a total hexane/alcohol solution ratio of 1.87 vol/vol in five extraction steps. Some unsaponifiables not extracted will remain in the final fatty acid extract, although unsaponifiable recovery here (48.7%) is better than in the original procedure (38%, Fig. 1) because the extraction is from an alcoholic phase with a lower water content (approx-

mately 25% w/w water, Fig. 1). Depending on the intended use of the final fatty acid extract, more extractions of unsaponifiables may be necessary.

Extraction of purified fatty acids. In early work (8) the pH of the alcoholic potassium salt solution was adjusted to 1 before extracting the purified fatty acids. However in some experiments carried out using the optimized conditions, emulsions formed when the pH was lowered to this value and hexane was added. At this point, solubility of surfactant agents such as proteins contained in the alcoholic solution may decrease with the change in pH. Even small amounts of these surfactant agents can accumulate in the alcoholic solu-

TABLE 2
Influence of the Hexane/Alcohol Solution Ratio (H/A) on the Unsaponifiable Extraction Yields (R_U) and Equilibrium Distribution Constants (K_U) of Unsaponifiables Between the Hexane and the Alcoholic Solution

H/A (vol/vol)	Extraction temperature 20°C		Extraction temperature 40°C	
	K_U^a	R_U^b (% w/w of β -carotene)	K_U^a	R_U^b (% w/w of β -carotene)
80.0	—	100	—	—
40.0	5.43	99.7	—	98.9
14.0	0.14	71.7	0.20	79.8
10.0	0.15	64.9	0.21	73.0
6.0	0.19	56.1	0.28	66.3
4.0	0.24	50.8	0.27	55.1
2.0	0.41	45.7	0.44	47.7
1.2	0.52	38.9	0.58	40.9
0.8	0.65	33.4	0.74	36.0
0.4	0.93	25.1	1.10	26.6

^a $K_U = C_{UH}/C_{UA}$, where C_{UH} is the concentration of unsaponifiables in the hexane phase and C_{UA} is the concentration of unsaponifiables in the alcoholic phase.
^bPercentage of unsaponifiables extracted with respect to the amount of unsaponifiables contained in the initial alcoholic solution.

TABLE 3
Comparison Between the Yields of Unsaponifiables Obtained by Extraction with Hexane and the Yield Predicted by the Equilibrium Data

Extraction ^a step	Unsaponifiable yield (% w/w of β -carotene)		
	Step ^b	Σ Step ^c	Equilibrium data ^d
1	26.0	26.0	29.1
2	9.0	35.0	40.0
3	6.3	41.3	45.6
4	4.3	45.6	50.0
5	3.1	48.7	53.5

^aExtractions were made at 20°C using a hexane/alcohol solution (40% w/w water) ratio (H/A) of 0.37 vol/vol per step.
^bUnsaponifiable yield obtained experimentally. Percentage of unsaponifiables extracted with respect to the amount of unsaponifiables contained in the alcohol solution.
^cUnsaponifiable yield obtained experimentally. Percentage of unsaponifiables extracted with respect to the amount of unsaponifiables contained in the initial alcohol solution.
^dUnsaponifiable yield obtained from the equilibrium data presented in Figure 2 [$C_{UH} = 0.10 \exp (0.217 C_{UA})$]. For abbreviations see Table 2.

TABLE 4
Influence of the Hexane/Alcohol Solution Ratio on the Fatty Acid Yields and Distribution Constants of Fatty Acids and Eicosapentaenoic Acid^a

H/A (vol/vol)	K_F	K_{EPA}	R_F (%)
14.0	—	—	100
10.0	—	—	99.4
6.0	—	—	98.7
4.0	17.8	18.5	98.3
2.0	16.2	16.9	97.1
1.2	15.0	15.8	97.4
0.8	15.9	16.8	92.6
0.4	18.5	17.8	83.6
0.2	26.1	25.0	81.7

^aExtraction temperature, 20°C. H/A = hexane/alcohol solution ratio. $K_F = C_{FH}/C_{FA}$, where C_{FH} is the fatty acid concentration in the hexane phase and C_{FA} is the fatty acid concentration in the alcohol phase. K_{EPA} = distribution constant for eicosapentaenoic acid (EPA) concentration in the hexane phase/EPA concentration in the alcoholic phase. R_F = percentage of fatty acids extracted with respect to the amount of fatty acids contained in the alcoholic solution.

TABLE 5
Comparison Between the Fatty Acid and EPA Yields Obtained by Hexane Extraction and Predicted by the Equilibrium Data

Extraction ^a step	Fatty acid yield (%)		Equilibrium data ^d	EPA yield (%)		Equilibrium data ^d
	Step ^b	Σ Step ^c		Step ^b	Σ Step ^c	
1	78.6	78.6	81.0	79.2	79.2	83.7
2	11.2	89.8	96.7	11.8	91.0	96.8
3	4.7	94.5	99.4	4.7	95.6	99.3
4	1.9	96.4	99.9	1.7	97.4	99.8

^aExtractions were made using a hexane/alcohol solution (40% w/w water) ratio of 0.20 vol/vol per step.

^bFatty acid (or EPA) yield obtained experimentally, expressed as percentage of fatty acids (or EPA) extracted with respect to the amount of fatty acids (or EPA) contained in the alcoholic solution.

^cFatty acid (or EPA) yield obtained experimentally, expressed as percentage of fatty acids (or EPA) extracted with respect to the amount of fatty acids (or EPA) contained in the initial alcohol solution.

^dFatty acid (or EPA) yields obtained from the equilibrium data presented in Figure 3; [$C_{FH} = 261.6 \exp(0.0174 C_{FA})$]. For abbreviations see Tables 2 and 4.

tion/hexane interface, hence stabilizing the emulsion. Thus, a study of the influence of pH on the fatty acid yield was carried out. Compared to the fatty acid and EPA yields obtained at pH 1, fatty acid and EPA yields did not decrease when pH was adjusted between 3 and 6. At pH 7, low fatty acid and EPA extraction yields were obtained presumably because the fatty acids were still partially in the form of potassium salts.

The equilibrium distribution of fatty acids between the hexane and alcoholic phases was similar to the equilibrium distribution of unsaponifiables. Table 4 shows that the recovery of fatty acids with hexane increases with the hexane/alcohol solution ratio. In this case, a quantitative extraction of fatty acids is possible using relatively low hexane/alcohol

phase ratios. The EPA distribution constants are similar to those of the overall fatty acids, so similar EPA yields can be obtained. The equilibrium data represented in Figure 3 enable prediction of the fatty acid yields when the extraction is done in one or several steps with different volumes of hexane. Table 5 compares the extraction yields obtained experimentally (by a four-step hexane extraction) to those based on a sequence of four batch extraction steps, assuming that equilibrium is reached in each step and that the two phases are totally immiscible (17). Good correlation between the two yields may be observed (less than 4% difference).

Comparison of the original and optimized process. The optimized conditions identified in this work were: 10 mL

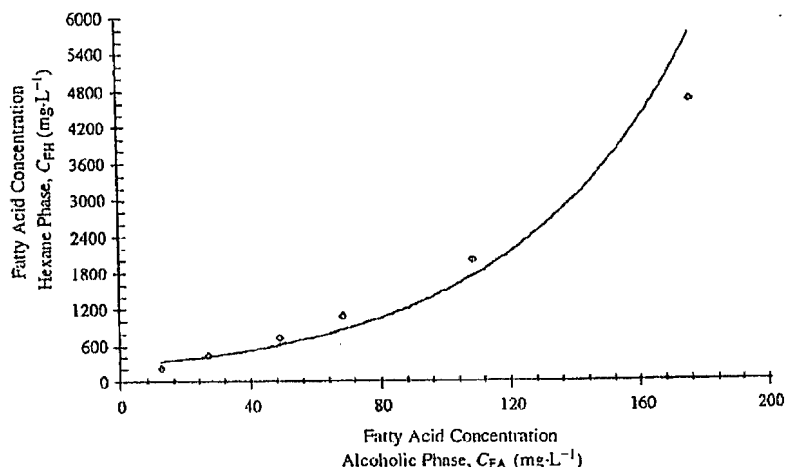


FIG. 3. Equilibrium distribution of fatty acids between the alcoholic (40% w/w water) phase and hexane at 20°C. The experimental data were fit by the equation $C_{FH} = 261.6 \exp(0.0174 C_{FA})$, with a correlation coefficient (r^2) of 0.9501. C_{FH} is the fatty acid concentration in the hexane phase ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and C_{FA} is the fatty acid concentration in the alcoholic phase; the mean deviation between the experimental C_{FH} and the values predicted by the equation is 20% of the experimental C_{FH} .

ethanol (96% vol/vol)/g biomass (2.09 mL/g wet biomass); washing of the biomass residue with 5 mL ethanol (96%)/g biomass; extraction of unsaponifiables by three extractions with 0.37 mL hexane/mL alcoholic solution (40% water w/w) each; and extraction of fatty acids by four extractions with 0.2 mL hexane/mL alcoholic solution (pH 6). The fatty acid yield was 87%, which was lower than the yield obtained in the original process (96.2%) (10). This is mainly because wet biomass was used instead of lyophilized biomass (see the last line in Table 1); however, elimination of the cost of lyophilization justifies this lower fatty acid yield. Figure 1 compares both original and optimized processes (amount in parentheses). As observed above, an important reduction in the amounts of hexane (about 90%) and ethanol (96%) (about 84%) has been achieved. In the earlier process the costs of extraction and purification to obtain highly purified EPA from *P. tricornutum* were estimated at about US\$188 per gram of 96% pure EPA, which included culture, extraction, concentration, and purification (10). By only optimizing the fatty acid extraction step, this cost could be reduced by about 20% (the production cost would be US\$150 per gram of highly purified EPA). The production cost of highly purified EPA from cod liver oil was estimated at about US\$369 per gram (10). After similar optimization, the cost of production of EPA from cod liver oil could only be reduced by about 8%, because only the volume of hexane in the final purification of the fatty acid was reduced. The extraction of fatty acids from cod liver oil is quite different, as the first step is saponification and it is not necessary to extract unsaponifiables (9,14). Although this method has been optimized for the microalga *P. tricornutum*, it can be extended to other microalgae such as *I. galbana* or *P. cruentum* with hardly any modification.

ACKNOWLEDGMENT

This work is supported by a research grant from the European Union: contract BRPR CT97-0537.

REFERENCES

1. Bajpai, P., and P.K. Bajpai, Eicosapentaenoic Acid (EPA) Production from Microorganisms: A Review, *J. Biotechnol.* 30: 161-183 (1993).
2. Connor, W.E., The Importance of n-3 Fatty Acids in Health and Disease, Conference on Highly Unsaturated Fatty Acids in Nutrition and Disease Prevention, *Abstract of International Conference on Highly Unsaturated Fatty Acids in Nutrition and Disease Prevention*, Chairmen: W.E. Connor and R. Muggli, Sponsored by F. Hoffman-La Roche Ltd., Basel, Switzerland. Conference celebrated in Barcelona, Spain, 4-6 November, 1996, p. 1.
3. Radwan, S.S., Sources of C20-Polyunsaturated Fatty Acids for Biotechnological Use, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:421-430 (1991).
4. Simopoulos, A.P., Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease and in Growth and Development, *Am. J. Clin. Nutr.* 54:438-463 (1991).
5. Rambjor, G.S., A.I. Walen, S.L. Windsor, and W.S. Harris, Eicosapentaenoic Acid Is Primarily Responsible for Hypotriglyceridemic Effect of Fish Oil in Humans, *Lipids* 31 (suppl. S):45-49 (1996).
6. Braden, L.M., and K.K. Carroll, Dietary Polyunsaturated Fat in Relation to Mammary Carcinogenesis in Rats, *Ibid.* 21:285-288 (1986).
7. Yongmanitchai, W., and O.P. Ward, Screening of Algae for Potential Alternative Sources of Eicosapentaenoic Acid, *Phytochemistry* 30:2963-2967 (1991).
8. Cartens, M., E. Molina Grima, A. Robles Medina, A. Giménez Giménez, and J. Ibáñez González, Eicosapentaenoic Acid (20:5n-3) from the Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:1025-1031 (1996).
9. Robles Medina, A., A. Giménez Giménez, F. García Camacho, J.A. Sánchez Pérez, E. Molina Grima, and A. Contreras Gómez, Concentration and Purification of Stearidonic, Eicosapentaenoic, and Docosahexaenoic Acids from Cod Liver Oil and the Marine Microalga *Isochrysis galbana*, *Ibid.* 72:575-583 (1995).
10. Molina Grima, E., A. Robles Medina, A. Giménez Giménez, and M.J. Ibáñez González, Gram-Scale Purification of Eicosapentaenoic Acid (EPA, 20:5n-3) from Wet *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 Biomass, *J. Appl. Phycol.* 8:359-367 (1996).
11. Giménez Giménez, A., M.J. Ibáñez González, A. Robles Medina, E. Molina Grima, S. García Salas, and L. Estebán Cerdán, Downstream Processing and Purification of Eicosapentaenoic (20:5n-3) and Arachidonic Acids (20:4n-6) from the Microalga *Porphyridium cruentum*, *Bioseparation* 7:89-99 (1998).
12. Whyte, J.N., Biochemical Composition and Energy Content of Six Species of Phytoplankton Used in Mariculture of Bivalves, *Aquaculture* 60:231-241 (1987).
13. Lepage, G., and C.C. Roy, Improved Recovery of Fatty Acid Through Direct Transesterification Without Prior Extraction or Purification, *J. Lipid Res.* 25:1391-1396 (1984).
14. Molina Grima, E., A. Robles Medina, A. Giménez Giménez, J.A. Sánchez Pérez, F. García Camacho, and J.L., García Sánchez, Comparison Between Extraction of Lipids and Fatty Acids from Microalgal Biomass, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71:955-959 (1994).
15. Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr, and R. Randall, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 193:265-275 (1951).
16. Hansmann, E., Pigment Analysis, in *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements*, edited by J.R. Stein, Cambridge University Press, Cambridge, 1973, pp. 359-368.
17. Coulson, J.M., and J.F. Richardson, *Ingeniería Química. Operaciones Básicas*, Reverté, Barcelona, 1988, tomo II, pp. 777-778.
18. Bligh, E.G., and W.J. Dyer, A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917 (1959).

Received March 16, 1998; accepted August 28, 1998

High-Yield Production of Lutein by the Green Microalga *Chlorella protothecoides* in Heterotrophic Fed-Batch Culture

Xian-Ming Shi

Key Laboratory of Microbiology of Agricultural Ministry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, P. R. China

Yue Jiang

Department of Biology, Hong Kong Baptist University, Kowloon Tong, Hong Kong, P. R. China

Feng Chen*

Department of Botany, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong, P. R. China

The green microalga *Chlorella protothecoides* was grown heterotrophically in batch mode in a 3.7-L fermenter containing 40 g/L glucose and 3.6 g/L urea. In the late exponential phase, concentrated nutrients containing glucose and urea were fed into the culture, in which the nitrogen source was sufficient compared to carbon source. As a result, a maximum cell dry weight concentration of 48 g/L was achieved. This cell dry weight concentration was 28.4 g/L higher than that obtained in batch culture under the same growth conditions. In another cultivation run, the culture was provided with the same initial concentrations of glucose (40 g/L) and urea (3.6 g/L) as in the batch mode, followed by a relatively reduced supply of nitrogen source in the fed-batch mode to establish a nitrogen-limited culture. Such a modification resulted in an enhanced lutein production without significantly lowering biomass production. The cellular lutein content was 0.27 mg/g higher than that obtained in the N-sufficient culture. The improvements were also reflected by higher maximum lutein yield, lutein productivity, and lutein yield coefficient on glucose. This N-limited fed-batch culture was successfully scaled up from 3.7 L to 30 L, and a three-step cultivation process was developed for the high-yield production of lutein. The maximum cell dry weight concentration (45.8 g/L) achieved in the large fermenter (30 L) was comparable to that in the small one (3.7 L). The maintenance of the culture at a higher temperature (i.e., 32 °C) for 84 h resulted in a 19.9% increase in lutein content but a 13.6% decrease in cell dry weight concentration as compared to the fed-batch culture (30 L) without such a treatment. The enhancement of lutein production resulted from the combination of nitrogen limitation and high-temperature stress.

Introduction

Lutein is an important carotenoid that has been widely used for the pigmentation of animal tissues and products, as well as for the coloration of foods, drugs, and cosmetics (Shi and Chen, 1999). Recently, lutein has been found to be effective in the prevention of age-related macular degeneration and certain cancers (Basu et al., 2001). Microalgae, particularly *Chlorella*, are a potential source of naturally occurring lutein (Shi et al., 1997).

Carotenoid biosynthesis is mostly investigated on higher plants. The biosynthetic process involves six steps, namely, formation of mevalonic acid, formation of geranylgeranyl pyrophosphate, formation of phytoene, desaturation of phytoene, and cyclization and formation of xanthophylls such as lutein (Gross, 1991). In *Chlorella*, xanthophylls can be synthesized in darkness, and α - and β -carotenes are the immediate precursors of xanthophylls

(Claes, 1959). Most carotenoids belong to secondary metabolites (Gross, 1991), whereas lutein is generally considered a primary carotenoid in microalgae (Siefermann-Harms, 1987).

Chlorella can be grown heterotrophically on an organic carbon source, which makes high cell density and productivity on a large scale possible (Chen, 1996). Optimization of yield is one of the most important determinants in heterotrophic mass culture of microalgae. Our previous results have indicated that optimum temperature and pH for heterotrophic cultivation of *Chlorella protothecoides* are 28 °C and pH 6.6, respectively (Shi, 1998; Shi et al., 1997). Also, glucose and urea are the most suitable carbon and nitrogen sources for heterotrophic production of lutein by *Chlorella protothecoides* in batch culture (Shi, 1998; Shi et al., 1997). To improve the yield and productivity of the algal biomass and lutein, nutrients that are limiting in batch cultures must be supplemented, which may be achieved through the use of a fed-batch system.

The nutrient elements most commonly in short supply soon becoming growth limiting in dense batch cultures

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 852-2299-0309. Fax: 852-2299-0311. Email: sfchen@hkusua.hku.hk.

of microalgae, are nitrogen and carbon (Oswald and Benemann, 1977). Fed-batch culture has proven useful for enhancing yield and productivity of algal biomass and metabolites (Chen and Johns, 1996; Chen and Zhang, 1997).

Nitrogen limitation and high temperature stress have been reported to enhance the accumulation of secondary carotenoids in certain species of green algae (Arad et al., 1993; Rise et al., 1994; Bar et al., 1995; Zhang et al., 1997). However, a temperature that is optimal for carotenoid formation is not necessarily optimal for algal growth (Zhang et al., 1997). Similarly, an algal culture grown on an N-limited medium might produce lower biomass than on an N-sufficient medium (Arad et al., 1993; Rise et al., 1994; Zhang et al., 1997). Nevertheless, little information is available concerning the influence of nitrogen limitation and high-temperature stress on the synthesis of lutein in *Chlorella* during heterotrophic cultivation. The aims of the present work are to investigate the influence of nitrogen supply and temperature stress on the production of biomass and lutein by *C. protothecoides* during fed-batch cultivation, to develop a process for the high-yield production of lutein by the microalga under heterotrophic conditions of growth.

Materials and Methods

Microalgal Strain. The microalgal strain used in this study was *Chlorella protothecoides* CS-41 obtained from the CSIRO Marine Laboratories, Hobart, Australia.

Medium. The modified Basal medium (Shi et al., 1997) supplemented with 40 g/L glucose and 3.6 g/L urea was used for the initial batch cultures in fermenters and in shake flasks. A 620-mL stock solution containing 240 g/L glucose and 14 g/L (for N-sufficient culture) or 7 g/L (for N-limited culture) urea was prepared as feed medium for algal growth in a 3.7-L fermenter. Another 5-L stock solution containing 240 g/L glucose and 7 g/L urea was prepared as feed for algal growth in a 30-L fermenter.

Standard and Solvents. Standard lutein was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All solvents were HPLC grade obtained from BDH Laboratory Supplies (Poole, England).

Cultivation. Sterilized medium was inoculated with 5% exponentially growing inocula. Heterotrophic cultivation of *C. protothecoides* CS-41 was carried out in shake flasks or in 3.7-L and 30-L fermenters (Bioengineering AG, Wald, Switzerland). The working volume of the culture in a 3.7-L fermenter was 2.5 L. The scale-up experiment was performed in a 30-L fermenter with a working volume of 20 L. The cultivation conditions in the fermenters were controlled as follows: pH, 6.6; temperature, 28 °C; agitation, 480 rpm; and dissolved oxygen concentration, 50% saturation. During fed-batch cultivation, the sterilized stock nutrient solution was fed into the fermenter at intervals so that glucose concentration in the cultures was kept at 10–30 g/L. For stock culture maintenance, the alga was incubated at 28 ± 1 °C in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL of sterilized medium under continuous shaking at 180 rpm.

Maintenance of Algal Culture at the Various Temperatures. When the maximum biomass concentration was achieved, the flask cultures were then divided into three portions and transferred to the different shakers at 24, 28, and 32 °C, respectively, for maintenance under continuous shaking (180 rpm). The retention percentages of biomass concentrations afterward were determined and calculated. Similarly, the culture temperature in the 30-L fermenter was finally switched to

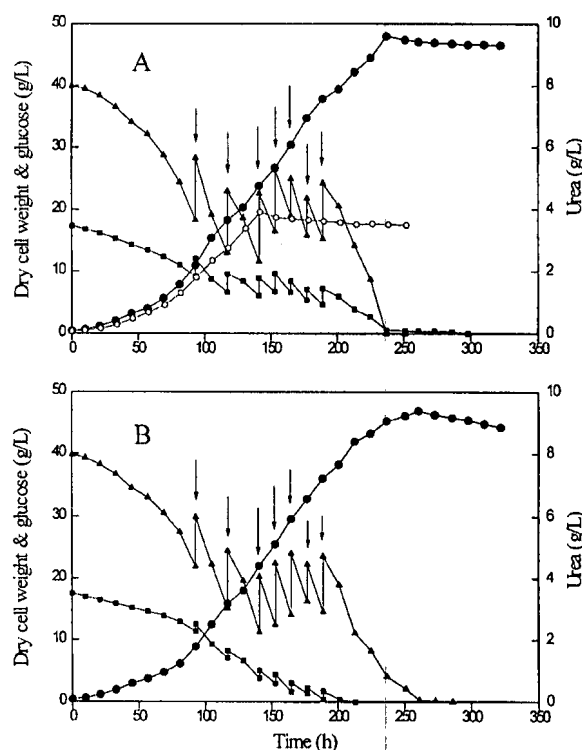


Figure 1. Heterotrophic growth of *C. protothecoides* CS-41 and its consumption of C- and N-sources in N-sufficient and N-limited fed-batch cultures in a 3.7-L fermenter: (A) N-sufficient feeding, (B) N-limited feeding; (●) biomass concentration [O, batch culture]; (▲) glucose; (■) urea; (I) feeding).

32 °C as described above for lutein accumulation during maintenance of algal culture.

Determination of Cell Dry Weight Concentration. The dry cell weight concentration was determined according to Chen et al. (1996).

Determination of Specific Growth Rate. Specific growth rate, μ , was determined according to Chen and Johns (1996).

Determination of Glucose Concentration. Glucose concentration was determined by HPLC according to the method previously reported (Shi et al., 1997).

Determination of Urea Concentration. Urea concentration was determined with urea nitrogen kits (Bun 66-20) obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Extraction and Determination of Lutein. A mechanical method was used for the extraction of lutein from the algal cells, and the lutein concentration was determined by HPLC according to Shi and Chen (1999).

Results and Discussion

Growth Pattern of N-Sufficient Cultures. Heterotrophic growth of the green microalga *Chlorella protothecoides* and its lutein formation was first investigated in a fed-batch system with N-sufficient supply using a 3.7-L fermenter. As shown in Figure 1A, no obvious lag phase was observed after inoculation, and the linear phase lasted for a comparatively long time until a maximum biomass concentration was achieved in the fed-batch culture. Figure 1A also shows the growth pattern of the batch culture with sufficient supply of urea. Compared with the batch culture, the maximum biomass concentration (48 g/L) achieved in the fed-batch culture was 28.4 g/L higher (Figure 1A). The biomass productiv-

Table 1. Heterotrophic Production of Biomass and Lutein by *C. protothecoides* in Fed-Batch Systems^a

N-feeding/ ferm size (L)	max biomass concn (g L ⁻¹)	biomass productivity (g L ⁻¹ d ⁻¹)			maximal lutein		lutein productivity (mg L ⁻¹ d ⁻¹)		μ (d ⁻¹)	Y_g (g g ⁻¹ gluc)	Y_u (g g ⁻¹ urea)	Y_{lm} (mg g ⁻¹ gluc)
		max	av	feeding period (d)	content (mg g ⁻¹)	yield (mg L ⁻¹)	max	av				
S/3.7	48.0	8.9	4.8	6.2	4.65	216.92	39.12	19.64	1.06	0.47	6.91	2.16
L/3.7	46.9	8.1	4.3	5.4	4.92	225.34	48.00	22.67	1.04	0.46	8.89	2.25
L/30	45.8	10.9	4.6	7.1	5.35	209.08	49.18	19.18	0.93	0.46	8.49	2.09

^a S = sufficient; L = limited; μ = specific growth rate; Y_g = cell growth yield on glucose; Y_u = cell growth yield on urea; Y_{lm} = Lutein yield on glucose. Values for the 30-L fermenter culture represent a combination of the results obtained before and after the temperature shift. Values of the yield of lutein of the three different cultures are significantly different at $p < 0.05$.

ity in the fed-batch culture was also much higher than that in the batch culture, although the specific growth rates in both cultures were comparable (Table 1). Previous studies indicated that urea was superior to the other nitrogen sources in terms of biomass and lutein production and that no inhibitory effect on the algal growth was observed when a urea concentration of 3.6 g/L was used (Shi, 1998). Therefore, a urea concentration of 3.6 g/L was used as the initial nitrogen concentration in the medium in this study. In the nutrient solution prepared for feeding, a urea concentration of 14 g/L was proven necessary to supply the culture to give a maximum biomass production, together with 240 g/L glucose according to the calculation of Shi et al. (1997).

Growth Pattern of N-Limited Cultures. Nitrogen limitation has been reported to enhance the production of secondary carotenoids but reduce the biomass yield (Arad et al., 1993; Zhang et al., 1997). In the present work, an N-limited culture was established as follows. Sufficient nitrogen was prepared in the initial medium to support the high-yield biomass production; then in fed-batch mode, half of the urea concentration (i.e., 7 g/L) was prepared in the feed solution, which was fed into the fermenter together with 240 g/L glucose. This modification was aimed to enhance the lutein production. The growth pattern of this nitrogen-limited culture is shown in Figure 1B, in which a slightly lower maximum biomass concentration and biomass productivity were obtained presumably as a result of N-limitation compared with those in the N-sufficient culture (Figure 1A, Table 1). However, in the N-limited culture, the decrease in maximum biomass concentration was only 2.3%, and the specific growth rate was almost identical to that in N-sufficient culture (Table 1). The reduction in maximum biomass concentration due to N-limitation was relatively small compared to that in previous reports (Ricke and Schaefer, 1996; Zhang et al., 1997).

Consumption of C- and N-Sources in Fed-Batch Cultures. The consumption of C- and N-sources in the two fed-batch cultures is also shown in Figure 1. At the end of cultivation, both glucose and urea were consumed completely (Figure 1). Urea was exhausted earlier than glucose in the N-limited culture (Figure 1B), but an inverse trend was observed in the N-sufficient culture (Figure 1A). The cell growth yield coefficient on glucose in the N-limited culture was almost identical to that in the N-sufficient culture (Table 1). In contrast, the cell growth-yield coefficients on urea in the N-sufficient and N-limited cultures were 6.91 and 8.89 g/g, respectively (Table 1). This means that more urea was used by the alga to produce an equivalent amount of biomass in N-sufficient culture than in the N-limited culture. When an element (such as nitrogen or phosphorus) is present in the environment in excess, algae are able to accumulate much more of this element than is required for normal metabolic function (Kuhl, 1974). Such a charac-

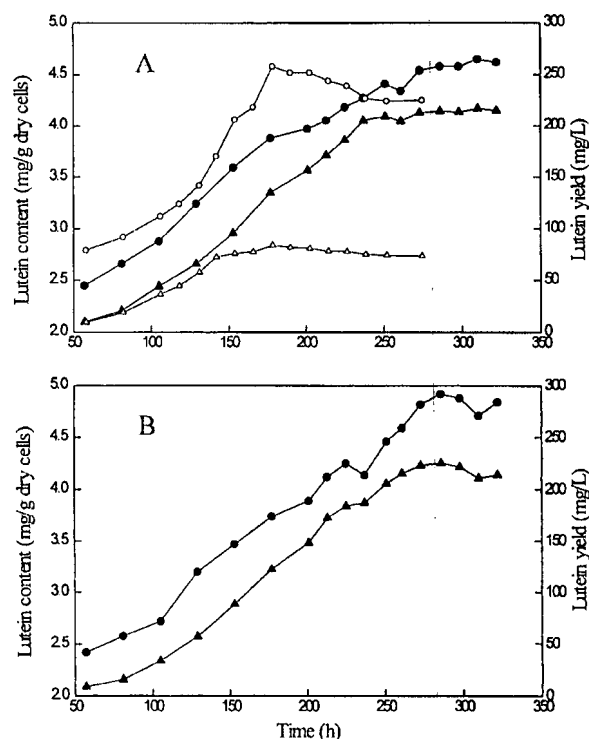


Figure 2. Heterotrophic production of lutein by *C. protothecoides* CS-41 in N-sufficient and N-limited fed-batch cultures in a 3.7-L fermenter: (A) N-sufficient feeding; (B) N-limited feeding; (●) lutein content; (▲) lutein yield [open symbols, batch culture].

teristic is sometimes useful, for instance, in the case of waste treatment (Oswald and Benemann, 1977).

Enhancement of Lutein Production by Nitrogen Limitation. Nitrogen limitation enhanced lutein production by *C. protothecoides* in heterotrophic fed-batch cultures. As shown in Figure 2, approximately 0.27 mg/g higher cellular lutein content was observed in the N-limited culture than that in the N-sufficient culture. This was also reflected by higher maximum lutein yield, lutein productivity, and lutein yield coefficient on glucose achieved in the N-limited culture (Figure 2, Table 1). In the N-sufficient fed-batch culture, cellular lutein content was comparable to that achieved in batch culture, although much higher lutein yield was obtained owing to a higher biomass concentration in the fed-batch culture (Figure 2A). The maximum biomass concentration and lutein content achieved in the heterotrophic cultures of *C. protothecoides* in this study were much higher than any (i.e., 19.6 g/L and 4.58 mg/g, respectively) so far reported in the literature (Shi et al., 2000).

Nitrogen limitation has been reported to enhance the synthesis of secondary carotenoids in certain species of

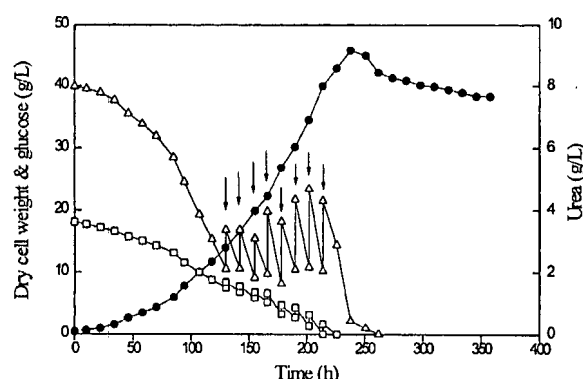


Figure 3. Heterotrophic growth of *C. protothecoides* CS-41 and its consumption of C- and N-sources in the N-limited feeding cultures in a 30-L fermenter: (●) biomass concentration; (Δ) glucose; (□) urea; (I) feeding). Temperature was shifted from 28 to 32 °C after 240 h of cultivation.

green algae (Arad et al., 1993; Rise et al., 1994; Bar et al., 1995; Zhang et al., 1997). However, few investigations have been carried out into its effect on the formation of lutein, which is generally considered as a primary carotenoid in microalgae (Siefermann-Harms, 1987). Both the formation patterns and amounts of carotenoids in the microalgal cells may be altered by changes in the composition of the growth medium and by the influence of cultivation parameters such as light, temperature, pH, and oxygen. The biosynthesis of secondary carotenoids is much more greatly influenced by environmental factors than the primary ones. However, it might be questioned when the algae are grown heterotrophically, since in this case carotenoids do not at all function as in photosynthesis, in which carotenoids act as light accessory pigments that are necessary for green organisms to grow photosynthetically. Under nitrogen limitation conditions, nitrogen metabolism (such as the synthesis of protein and chlorophylls) in the algal cells decreases. As a result, the synthetic activities of carotenoids and other non-nitrogen compounds increase.

Scale-Up Cultivation for High-Yield Production of Lutein. In a 3.7-L fermenter, high-yield production of lutein by heterotrophic *C. protothecoides* was performed with nitrogen-limited feeding, and a cell dry weight concentration of 46.9 g/L and a cellular lutein content of 4.92 mg/g were achieved (Table 1). This production process was successfully scaled up to 30 L, and the maximum biomass concentration (45.8 g/L dry cells) achieved in the large fermenter (30 L) was comparable to that in the small one (3.7 L). As shown in Figure 3, no lag phase was observed in the culture in the 30-L fermenter, which was similar to that in the 3.7-L fermenter. Nevertheless, growth was relatively slow in the large fermenter (30 L) compared to that in the small one, which might be due to poorer mixing and mass transfer in the large fermenter. The consumption of C- and N-sources in the two N-limited cultures was similar. Urea was consumed earlier than glucose, which remained in the cultures at a very low concentration when the maximum cell dry weight concentrations were reached (Figures 1B and 3). The cell growth yield coefficients on glucose in the two cultures were identical, being 0.46 g/g (Table 1).

Enhancement of Lutein Production by High-Temperature Stress. The influence of temperature on the maintenance of the alga at high densities and on the accumulation of lutein in the cells was first carried out in shake flasks under N-sufficient conditions. The cell

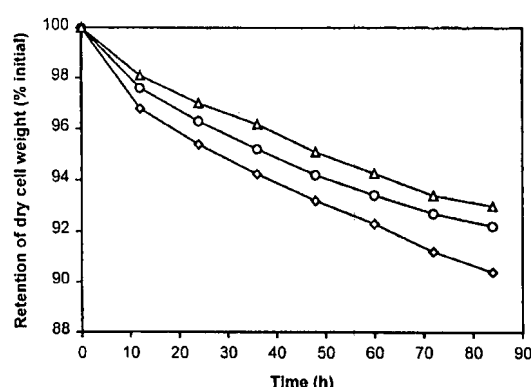


Figure 4. Influence of temperature on the biomass maintenance of *C. protothecoides* culture in shake flasks under N-sufficient conditions: (Δ) 24 °C; (○) 28 °C; (◇) 32 °C.

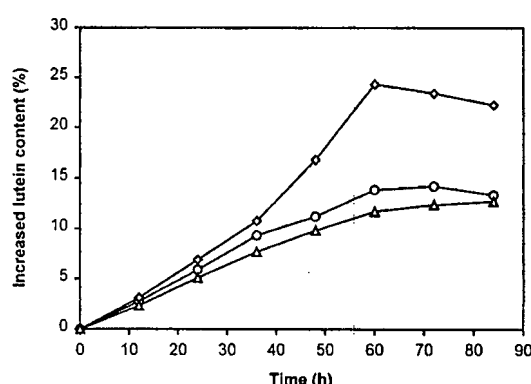


Figure 5. Influence of temperature on lutein accumulation in *C. protothecoides* cells of shake flask N-sufficient cultures during maintenance: (Δ) 24 °C; (○) 28 °C; (◇) 32 °C.

dry weight concentrations of the culture decreased by 7.0%, 7.8%, and 9.6%, respectively, compared to the initial concentration (Figure 4) during an 84-h maintenance at temperatures of 24, 28, and 32 °C. In contrast, the lutein contents of the corresponding cultures increased by 12.7%, 14.2%, and 24.3%, respectively (Figure 5). Approximately 10% more lutein was accumulated in the algal cells at the expense of 2% cells at 32 °C compared to that at 28 °C. The strategy that enhanced lutein production by using high-temperature stress was applied to fed-batch culture after a maximum cell dry concentration was achieved in a 30-L fermenter.

The maintenance of the fed-batch culture at 32 °C for 84 h resulted in a 19.9% increase in lutein content (Figure 6) but a 13.6% decrease in cell dry weight concentration (Figure 3) as compared to the fed-batch culture (in 37-L fermenter) without such a high temperature treatment. These results indicated that more significant shifts in cell dry weight concentration but smaller differences in cellular lutein content were found in the fermenter culture than in flask cultures, respectively (Figures 3–6). The initial cell dry weight concentration in flask batch cultures was about 1/3 of that in the fermenter fed-batch culture. It is generally agreed that the cells at high densities may die readily since more maintenance energy is required than in dilute culture (Chen and Johns, 1995). The initial cellular lutein content in the fermenter culture was higher as a result of N-limitation than that in the flask culture, and hence the enhancement in lutein accumulation in the former was not as obvious as in the latter.

By comparing the two N-limited fermenter cultures, high temperature (32 °C) stress in the 30-L fermenter

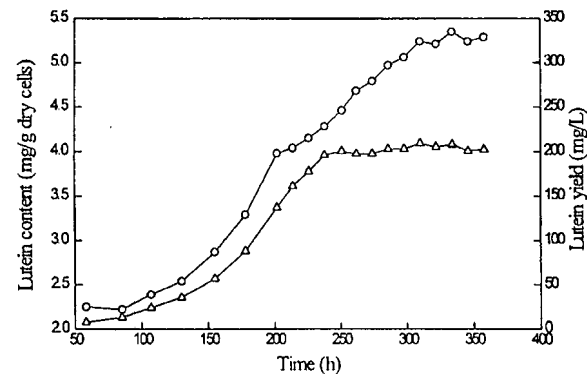


Figure 6. High-yield production of lutein by nitrogen limitation and high-temperature stress in a fed-batch culture of heterotrophic *C. protothecoides* in a 30-L fermenter: (○) lutein content; (Δ) lutein yield.

markedly enhanced lutein accumulation in *C. protothecoides*; a 8.7% higher lutein content was observed in this culture than in that maintained at 28 °C in the 3.7-L fermenter (Figures 2B and 6; Table 1), although whether such a difference was partially due to the different fermenter sizes was not certain and required further investigation. The maximum lutein yield and yield coefficient on glucose in the former were, however, slightly lower than those in the latter because of a relatively low maximum cell dry weight concentration (Table 1).

It is noted that the maximum lutein content of the N-limited fed-batch culture in the 30-L fermenter increased by 15.1% compared to that of the N-sufficient fed-batch culture in the small fermenter (Table 1). It should be indicated that this increase is probably attributed to the combined effects of the stresses, namely, nitrogen limitation and high temperature.

Conclusions

In this work, the nitrogen-limited fed-batch culture was successfully scaled up from 3.7 to 30 L, and a three-step cultivation process was developed for the high-yield production of lutein. This process includes the algal cultivation at 28 °C with sufficient nitrogen supply initially, followed by feeding the culture with limited nitrogen at the same temperature; the culture was finally maintained at 32 °C for the enhancement of lutein accumulation. This three-step process has shown potential for commercial application.

Acknowledgment

This research was supported by the Research Grants Council of Hong Kong and partially by the Grants of the Ministry of Education, P. R. China.

References and Notes

Arad, S.; Cohen, E.; Ben Amotz, A. Accumulation of canthaxanthin in *Chlorella emersonii*. *Physiol. Plant.* **1993**, *87*, 232–236.

Bar, E.; Rise, M.; Vishkautsan, M.; Arad, S. M. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *J. Plant Physiol.* **1995**, *146*, 527–534.

Basu, H. N.; Del Vecchio, A. J.; Flider, F.; Orthofer, F. T. Nutritional and potential disease prevention properties of carotenoids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, *78*, 665–675.

Chen, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 421–426.

Chen, F.; Johns, M. R. A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. *J. Appl. Phycol.* **1995**, *7*, 43–46.

Chen, F.; Johns, M. R. High cell density culture of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate using fed-batch and hollow-fibre cell-recycle systems. *Biores. Technol.* **1996**, *55*, 103–110.

Chen, F.; Zhang, Y. M.; Guo, S. Y. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 603–608.

Chen, F.; Zhang, Y. M. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 221–224.

Claes, H. Biosynthese von carotinoiden bei *Chlorella*, v. die trennung von licht- und dunkelreaktionen bei der lichtabhängigen xanthophylls synthese von *Chlorella*. *Z. Naturforsch. B: Chem. Sci.* **1950**, *14*, 4–7.

Gross, J. *Pigments in Vegetables, Chlorophylls and Carotenoids*; Van Nostrand Reinhold: New York, 1991.

Kuhl, A. In *Algal Physiology and Biochemistry*; Stewart, W. D. P., Ed.; Blackwell Scientific: Oxford, 1974; pp 636–654.

Oswald, W. J.; Benemann, J. R. A critical analysis of bioconversion with microalgae. In *Biological Solar Energy Conversion*; Mitsui, A., Miyachi, S., San-Pietro, A., Tamura, Eds.; Academic Press: New York, 1977; pp 379–398.

Ricke, S. C.; Schaefer, D. M. Growth and fermentation responses of *Selenomonas ruminantium* to limiting and nonlimiting concentrations of ammonium chloride. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *46*, 169–175.

Rise, M.; Cohen, E.; Vishkautsan, M.; Cojocar, M.; Gottlieb, H. E.; Arad, S. M. Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *J. Plant Physiol.* **1994**, *144*, 287–292.

Shi, X. M. High yield production of lutein by *Chlorella protothecoides* under heterotrophic conditions of growth. Ph.D. Thesis, The University of Hong Kong, 1998.

Shi X. M.; Chen, F. Production and rapid extraction of lutein and the other lipid-soluble pigments from *Chlorella protothecoides* grown under heterotrophic and mixotrophic conditions. *Nahrung/Food* **1999**, *43*, 109–113.

Shi X. M.; Chen, F.; Yuan, J. P.; Chen, H. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains. *J. Appl. Phycol.* **1997**, *9*, 445–450.

Shi X. M.; Zhang, X. W.; Chen, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 312–318.

Sieffermann-Harms, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* **1987**, *69*, 561–568.

Zhang, D. H.; Lee, Y. K.; Ng, M. L.; Phang, S. M. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* **1997**, *9*, 147–155.

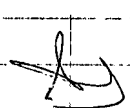
Accepted for publication June 5, 2002.

BP0101987

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020	Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD 13 8 22	Recorrido: 4
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	~~13~~		
2	10.13A253	9	7
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

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

Observaciones:	
anexan cd contiene un	
Total de 2 archivos:	
1 en Formato PDF el cual fue procesado	
1 en Formato Bloc de notas el cual por no	
cumplir con lo estipulado en la Circular Unica no	
fue procesado.	
	

**Un método para modificar químicamente un lípido de microalga,
un método para elaborar un jabón y una composición de lípidos
de microalga saponificados**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La invención es concerniente con los campos de ingeniería genética, acuacultura y la modificación química de biomasa microbiana que contiene lípidos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La demanda incrementada de energía por la economía global ha colocado presión incrementada en el costo de los combustibles fósiles. Esto, junto con el interés incrementado en reducir la contaminación del aire, ha incentivado el desarrollo de suministros de energía domésticos y disparado el desarrollo de combustibles sin petróleo para motores de combustión interna. Para los motores de ignición por compresión (diesel), ha demostrado que los esteres de alcohol simples de ácidos grasos (biodiesel) son aceptables como un combustible diesel alternativo. El biodiesel tiene un contenido de oxígeno más alto que el diesel derivado de combustibles fósiles y por consiguiente reduce emisiones de materia en partículas, hidrocarburos y monóxido de carbono, en tanto que también reduce las emisiones de azufre debido a un contenido de azufre bajo (Sheehan, J , et al , Life Cycle Inventory of Biodiesel

and Petroleum Diesel for Use in an Urban Bus, National Renewable Energy Laboratory, Report NREL/SR-580-24089, Golden, Colo (1998), Graboski, M S , and R L McCormick, Prog Energy Combust Sa , 24 125-164 (1998)).

5 Los esfuerzos iniciales en la producción, pruebas y uso de biodiesel emplearon aceites vegetales comestibles refinados (expulsados o recuperados por extracción de solventes de semillas de aceite) y grasas animales (por ejemplo, sebo de res) como materias primas para la síntesis de combustibles
10 (véase, por ejemplo Krawczyk, T , INFORM, 7 800- 815 (1996), and Peterson, C L , et al , Applied Engineering in Agriculture, 13 71-79 (1997)). La refinación adicional de los métodos ha permitido la producción de metiles esteres de ácidos graso (FAME) a partir de materias primas de lípidos menos altamente
15 refinadas más baratas tales como grasas de restaurante agotada y pasta de neutralización procedente de refinado alcalino o parafina amorfa de soya (véase, por ejemplo Mittelbach, M , and P Tntthart, J Am Oil Chem Soc , 65(7) 1185-1187 (1988), Graboski, M S , et al , The Effect of Biodiesel Composition on
20 Engine Emissions from a DDC Senes 60 Diesel Engine, Final Report to USDOE/National Renewable Energy Laboratory, Contract No ACG-8-17106-02 (2000)). La extracción de estos aceites para uso como material de partida contribuye significativamente al costo de la producción de biodiesel tradicional.

25 Similar a los procesos de extracción de solventes

utilizados para extraer aceites a partir de materiales de plantas secas, la extracción por solventes de aceites a partir de biomasa microbiana se lleva a cabo en presencia de un solvente orgánico. La extracción de solventes en este contexto
5 requiere el uso de un solvente y es esencialmente igniscible en agua, tal como hexano para producir una fase de solvente, en la cual el aceite es soluble y una fase acuosa, que retiene la porción extensamente sin lípidos de la biomasa. Desafortunadamente, en una producción a escala industrial, el
10 volumen de solventes orgánicos volátiles, potencialmente carcinógenos e inflamables que debe ser usado para la extracción eficiente crea condiciones de operación peligrosas que tienen tanto aspectos de seguridad ambientales como de los trabajadores. Además, el proceso de extracción de solventes
15 genera una corriente de desperdicio de solventes sustancial que requiere el descenso apropiado, incrementando mediante esto los costos de producción globales.

Alternativamente, se han reportado procesos de extracción "sin solventes"; éstos emplean un solvente acuoso
20 que comprende no más de aproximadamente 5% de solvente orgánico para extraer lípidos a partir de microorganismos para uso como materia prima en un proceso de transesterificación para la producción de biodiesel. Brevemente, el proceso de extracción "sin solventes" incluye poner en contacto una mezcla celular
25 sometida a lisis con un solvente acuoso que contiene no más de

aproximadamente 5% de solvente orgánico (por ejemplo, hexano) para producir una mezcla separada en fases. La mezcla comprende una capa acuosa más pesada y una capa más ligera que comprende lípidos emulsificados. El proceso de extracción es efectuado repetidamente sobre la capa de lípidos más ligera hasta que se obtiene una capa de lípidos no emulsificada. Desafortunadamente, el aislamiento y lavado repetidos de la capa de lípidos hace al proceso "sin solventes" particularmente laborioso.

Hay necesidad de métodos más baratos, más eficientes para extraer biomoléculas valiosas derivadas de lípidos producidos por microorganismo. La presente invención satisface esta necesidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención es concerniente con el descubrimiento de que la modificación química directa de biomasa microbiana que contiene lípidos puede incrementar espectacularmente la eficiencia y disminuir el costo de obtener materiales valiosos derivados de aquellos lípidos. Así, en una primera modalidad, la invención provee un método para modificar químicamente biomasa microbiana que contiene lípidos que incluye las etapas que cultivaron la población de microbios, cosechar la biomasa microbiana que contiene por lo menos 5% de lípidos por peso seco de células

(DCW) y someter la biomasa a una reacción química que modifica covalentemente por lo menos 1% de lípidos. En algunas modalidades, el método incluye además separar el lípido modificado covalentemente de otros componentes de la biomasa.

5 En varias modalidades, la proporción de lípido modificado covalentemente a la biomasa de la cual es separada es de entre 10% de lípido y 90% de biomasa y 90% de biomasa y 10% de lípido en peso seco. En algunas modalidades, la etapa de separar el lípido de otros componentes de la biomasa incluye
10 una etapa de separación de fases en la cual los lípidos modificados covalentemente forman una fase acuosa más ligera y componentes de la biomasa forman una o más fases más pesadas. En algunas modalidades, la biomasa es metida a la reacción química sin una etapa de enriquecimiento previo que incrementa
15 la proporción de los lípidos al material sin lípidos por más de 50% en peso. En otras modalidades, la biomasa es sometida a la reacción química con una etapa de enriquecimiento previo que incrementa la proporción de lípidos al peso seco de los microbios. En algunas modalidades, la biomasa cosechada no es
20 sometida a ningún tratamiento diferente a la remoción y agua y/o lisis de las células antes de la reacción química. En algunas modalidades, la biomasa sometida a la reacción química contiene componentes diferentes al agua en las mismas proporciones relativas como el cultivo celular. En algunas
25 modalidades, el contenido de lípidos en la biomasa es de 90% de

la biomasa sometida a la reacción química.

En una modalidad, la modificación química de la biomasa microbiana que contiene lípidos comprende transesterificar la biomasa para generar una fase lipofílica
5 que contiene alquilesteres de ácido graso una fase hidrofílica que contiene material celular y glicerol. En algunas modalidades, el método comprende además remover agua de la biomasa antes de someter la biomasa a la reacción química de transesterificación. En otras modalidades, el método comprende
10 además remover el agua de la biomasa después de la disrupción de la biomasa. En algunas modalidades, la remoción de agua de la biomasa es efectuada utilizando un método seleccionado del grupo que consiste de liofilización, secado del tambor y secado en horno de la biomasa.

15 En algunas modalidades, en las cuales la modificación química de la biomasa microbiana que contiene lípidos comprende transesterificar la biomasa, el método comprende además someter a disrupción la biomasa antes de la transesterificación de la biomasa. En algunas modalidades, el agua es removida de la
20 biomasa antes de la disrupción de la biomasa. En algunas modalidades la disrupción de la biomasa comprende calentar la biomasa para generar un lisado. En otras modalidades, la disrupción de la biomasa comprende poner en contacto la biomasa con un ácido o base suficiente para generar un lisado. En
25 todavía otras modalidades, la disrupción de la biomasa

comprende poner en contacto la biomasa con una o más enzimas para generar un lisado. En algunas modalidades, la biomasa es puesta en contacto con por lo menos una proteasa y por lo menos una enzima degradante de polisacárido. En algunas modalidades, la disrupción de la biomasa comprende someter a lisis mecánicamente la población de microbios para generar un lisado. En otras modalidades, la disrupción de la biomasa comprende someter la biomasa a choque osmótico para generar un lisado. En todavía otras modalidades, la disrupción de la biomasa comprende infectar la población de microbios con un virus lítico para generar un lisado. En otras modalidades, la disrupción de la biomasa comprende inducir la expresión de un gen lítico dentro de la población de microbios para promover la autólisis y generación de un lisado.

En algunas modalidades del método de modificación química en las cuales la reacción química comprende transesterificación, los alquil esteres de ácido graso son metil esteres de ácido graso o etil esteres de ácido graso. En algunas modalidades, la transesterificación de la biomasa comprende poner en contacto la biomasa con un alcohol y una base. En algunas modalidades, el alcohol es seleccionado de metanol, etanol, propanol, isopropanol y mezclas de los mismos. En algunas modalidades, la base es seleccionada de NaOH, KOH y mezclas de los mismos. En una modalidad, el alcohol es metanol y la base es NAOH. En algunas modalidades, la

transesterificación de la biomasa comprende poner en contacto la biomasa con un alcohol y una lipasa. En algunas modalidades, la lipasa es expresada de un gen de lipasa exógeno dentro de la población de microbios. En algunas modalidades, la expresión
5 del gen de lipasa exógeno es inducida al poner en contacto la biomasa con un estímulo para activar un promotor inducible que controla la expresión del gen de lipasa exógeno.

En varias modalidades, la cantidad de calcio y magnesio, combinadas, en peso en la fase lipofílica no es mayor
10 de 5 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad de fósforo en la fase lipofílica no es mayor de 0.001% en masa. En algunas modalidades, la cantidad de azufre en la fase lipofílica no es mayor de 15 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad de potasio y sodio combinadas, en peso
15 en la fase lipofílica no es mayor de 5 partes por millón. En algunas modalidades, el contenido de carotenoide total de la fase lipofílica no es mayor de 100 microgramos de carotenoide por gramo. En algunas modalidades, el contenido total de clorofila en la fase lipofílica no es mayor de 0.1 mg/Kg.

20 En algunas modalidades, el someter la biomasa a una reacción química incluye poner en contacto la biomasa con una enzima para catalizar la reacción química. En algunas modalidades, la enzima es una lipasa. En una modalidad, el método comprende además separar una fase lipofílica que
25 contiene los lípidos modificados covalentemente del material

celular hidrofílico de la biomasa.

En varias modalidades de la presente invención, los microbios y la biomasa microbiana resultante son seleccionados del grupo que consiste de bacterias, cianobacterias, microalgas eucarióticas, levadura oleaginosa y hongos. En algunas modalidades, los microbios son seleccionados del grupo que consiste de microalgas eucarióticas enlistadas en la Tabla 1. En algunas modalidades, los microbios son una especie del género *Chlorella* y en varias modalidades, la especie es seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella fusca*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*; *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella ellipsoidea*. En una modalidad, la especie es *Chlorella protothecoides*. En algunas modalidades, el microbio es una especie del género *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca stagnora*, *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis* y *Prototheca zopfii*. En algunas modalidades, los microbios son seleccionados del grupo que consiste de la levadura oleaginosa enlistada en la Tabla 2 y en otras modalidades, los microbios son seleccionados del grupo que consiste de los hongos enlistados en la Tabla 3. En algunas modalidades, la biomasa microbiana comprende una mezcla de biomasa de dos cepas de especies distintas de microbios que han sido cultivadas separadamente. En una modalidad, por lo menos dos de las distintas cepas o especies de microbios tienen perfiles de

glicerolípidos diferentes. En algunas modalidades, la especie tiene un alto grado de similaridad taxonómica a miembros de los géneros *Chlorella* o *Prototheca*, tal como por lo menos 95% de identidad de nucleótidos en el nivel rARN 23S como se revela en los ejemplos.

En varias modalidades de la presente invención, la biomasa cosechada comprende un contenido de lípidos de por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85% o por lo menos 90% en DCW. En algunas modalidades, por lo menos 20% de lípido es C18. En algunas modalidades, por lo menos 30% del lípido es C18. En algunas modalidades, por lo menos 40% es del lípido C18. En algunas modalidades, por lo menos 50% del lípido es de C18. En algunas modalidades, por lo menos 50% del lípido es de C16 o de longitudes de cadena más largas. En algunas modalidades, por lo menos 10% del lípido es de C14 o de longitudes de cadena más cortas. En algunas modalidades, por lo menos 20% del lípido es de C14 o de longitudes de cadena más cortas.

En algunas modalidades de la presente invención, la población de microbios expresa un gen de utilización de sacarosa exógeno. En algunas modalidades, el gen es una

sacarosa invertasa. En algunas modalidades, la población de microbios expresa una enzima de ruta de lípido exógena. En algunas modalidades, la enzima de ruta de lípido comprende una acil-ACP tioesterasa. En algunas modalidades, la población de microbios expresa además una proteína portadora de acilo "naturalmente coexpresada" exógena que es coexpresada con la acil-ACP tioesterasa. En algunas modalidades, la enzima de ruta de lípidos tiene especificidad para actuar sobre un sustrato que tiene un número específico de átomos de carbono en una cadena.

En algunas modalidades, la modificación química de la biomasa microbiana que contiene lípidos comprende hidrogenación de la biomasa para saturar por lo menos un subconjunto de enlaces insaturados en el lípido. En algunas modalidades, la modificación química de la biomasa microbiana que contiene lípidos comprende interesterificar la biomasa para generar una mezcla de glicerolípidos que tienen una distribución modificada de constituyentes de ácido graso en relación con los glicerolípidos en la biomasa cosechada. En algunas modalidades, la modificación química de la biomasa microbiana que contiene lípidos comprende hidroxilación de la biomasa para generar lípidos hidroxilados. En algunas modalidades, por lo menos una porción de los lípidos hidroxilados son esterificados para generar estolatos. En algunas modalidades, la modificación química de la biomasa microbiana que contiene lípidos comprende

hidrolizar la biomasa para generar ácidos grasos libres a partir de lípidos. En algunas modalidades, la modificación química de la biomasa microbiana que contiene lípidos comprende desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno y un catalizador, isomerización en presencia de hidrógeno y un catalizador y remoción de gases y compuestos nafta.

En otra modalidad, la modificación química de la biomasa microbiana que contiene lípidos comprende taponificación de la biomasa para generar sales de ácido graso a partir de lípidos. En una modalidad, la biomasa es derivada de una microalga del género *Prototheca*. En algunas modalidades, la saponificación de la biomasa comprende poner en contacto la biomasa con una base suficiente para convertir por lo menos una porción del glicerolípido y/o componentes de éster de ácido graso del lípido a sales de ácido graso. En algunas modalidades, la base es un hidróxido de metal alcalino, tal como NaOH o KOH. En algunas modalidades, el método comprende además poner en contacto la biomasa con una sal para precipitar las sales de ácido graso de la solución. En algunas modalidades, la sal comprende un haluro de metal alcalino soluble en agua, tal como NaCl o KCl.

En algunas modalidades, dos cepas o especies distintas de microbios son cultivados separadamente y la biomasa de ambos cultivos es mezclada antes de someter la biomasa a una reacción química que modifica por lo menos 1% del

lípidos. En algunas modalidades, por lo menos dos de las distintas cepas de microbios tienen perfiles de glicerolípido diferentes.

En un aspecto, la presente invención es concerniente con un método de saponificación para fabricar un jabón. En algunas modalidades, el método incluye cultivar una población de microbios, cosechar biomasa microbiana que contiene por lo menos 5% de lípidos en DCW, en los que se incluyen glicerolípidos o ésteres de ácido graso y someter la biomasa a una reacción de hidrólisis alcalina para producir un jabón a partir de la composición química o por lo menos una porción de los glicerolípidos o ésteres de ácido graso a sales de ácido graso. En algunas modalidades, la reacción de hidrólisis alcalina incluye poner en contacto la biomasa con la base y opcionalmente calentar la biomasa. En algunas modalidades, la base es un hidróxido de metal alcalino tal como NaOH o KOH. EN algunas modalidades, menos del 100% de los glicerolípidos y ésteres de ácido graso en la biomasa son convertidos a sales de ácido graso. En algunas modalidades, menos del 1% de los glicerolípidos y ésteres de ácido graso en la biomasa son convertidos a sales de ácido graso.

En algunas modalidades del método de saponificación, el método comprende además separar sustancialmente las sales de ácido graso de otros componentes de la biomasa. Algunos métodos de la invención comprenden además someter a ebullición las

sales de ácido graso separadas en agua y re-precipitar las sales de ácido graso al introducir una sal a la solución acuosa para producir un jabón purificado. En algunas modalidades, la sal es un haluro de metal alcalino soluble en agua tal como

5 NaCl o KCl.

Algunos métodos de saponificación de la invención comprenden además combinar el jabón purificado o composición de aceite saponificada con uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste de aceites esenciales, aceites de fragancia,

10 aceites de sabor, botánicos, extractos, extractos de CO₂, arcillas, colorantes, dióxido de titanio, micas, hierbas matizantes, agentes de dedicamiento, exfoliantes, semillas de frutas, fibras, polvos de grano, harinas de nuez, harinas de semilla, perlas de aceite, perlas de cera, hierbas, hidrosoles,

15 vitaminas, polvos de leche, conservadores, antioxidantes, tocoferoles, sales, azúcares, aceites vegetales, ceras, glicerina, vegetales de mar, aceites nutritivos, aceites humectantes, mantequillas vegetales, propilenglicol, parabenos, miel, cera de abeja, aloe, polisorbato, almidón de maíz, polvo

20 de cocoa, polvo de coral, humectantes, gomas, agentes emulsificantes y espesantes. En una modalidad, la mezcla es empacada como un producto cosmético. En otra modalidad, el producto cosmético comprende un limpiador facial.

En algunas modalidades del método de saponificación,

25 la proporción de sales de ácido graso a la biomasa del cual son

separados es entre 10% de sales de ácido graso a 90% de biomasa y 90% de sales de ácido graso a 10% de biomasa en peso seco. En algunos métodos, la biomasa es sometida a la reacción de hidrólisis alcalina sin una etapa de enriquecimiento previo que
5 incrementa la proporción de lípido al material de no lípido en la biomasa por más del 50% en peso. En algunos métodos, la biomasa cosechada no es sometida a tratamientos diferentes a lisis antes de la reacción de hidrólisis alcalina. En otros métodos, la biomasa es sometida a la reacción de hidrólisis
10 alcalina con una etapa de enriquecimiento previo que incrementa la proporción de material lípido a material no lípido en la biomasa en comparación con la proporción en la cosecha. En algunas modalidades, la biomasa sometida a la reacción de hidrólisis alcalina contiene componentes diferentes al agua en
15 las mismas proporciones relativas como la biomasa en la cosecha. En algunas modalidades, el lípido comprende no mas del 90% de la biomasa sometida a la reacción de hidrólisis alcalina.

En algunas modalidades del método de saponificación,
20 la biomasa cosechada comprende un contenido de lípidos de por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por
25 lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85% o por lo menos

90% de DCW. En algunas modalidades, el lípido comprende por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90% o por lo menos 95% de constituyentes de ácido graso saturado.

5 En algunas modalidades, el método de saponificación además comprende someter a disrupción la biomasa antes de establecer la biomasa a la reacción de hidrólisis alcalina. En algunas modalidades, la disrupción de la biomasa comprende someter a lisis mecánicamente la población de microbios para
10 generar un lisado. En algunas modalidades, el aceite es extraído de la biomasa antes que la saponificación. En algunas modalidades, el aceite extraído está sustancialmente libre de color o pigmentos.

 En otro aspecto, la presente invención es
15 concerniente con una composición que comprende una fase más ligera que contiene alquilésteres de ácido graso y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana.

 En varias modalidades de la composición, por lo menos 20% de los alquilésteres de ácido graso son de C18. En algunas
20 modalidades, por lo menos el 30% de los alquilésteres de ácido graso son de C18. En algunas modalidades, por lo menos 40% de los alquilésteres de ácido graso son C18. En algunas modalidades, por lo menos 50% de los alquilésteres de ácido graso son de C18. En algunas modalidades, por lo menos 50% de
25 los alquilésteres de ácido graso son C16 o de longitudes de

cadena más largas. En algunas modalidades, por lo menos 10% de alquilésteres de ácido graso son C14 o de longitudes de cadena más cortas. En algunas modalidades, por lo menos 20% de los alquilésteres de ácido graso son de C14 o de longitudes de
5 cadena más cortas.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una composición que comprende una fase más ligera que contiene lípidos completamente saturados y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana. En
10 otro aspecto, la presente invención es concerniente con una composición que comprende una fase más ligera que contiene lípidos y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana de más de una especie o cepa. En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una composición que
15 comprende una fase más ligera que contiene lípidos hidroxilados y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana. En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una composición que comprende una fase más ligera que contiene ácidos grasos libres y por lo menos una
20 fase más pesada que contiene biomasa microbiana.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con una composición que comprende aceite saponificado derivado de la hidrólisis alcalina de biomasa producida al cultivar una población de microbios. En algunas
25 modalidades, la composición comprende además por lo menos uno y

opcionalmente más de un aceite seleccionado del grupo de aceites que consisten de aceite de soja, aceite de colza, canola, palma, de semilla de balma, coco, maíz, vegetal de desperdicio, cebo chino, oliva, girasol, semilla de algodón, 5 grasa de pollo, cebo de res, cebo porcino, microalgas, microalgas, Cuphea, lino, cacahuate, sebo blanco de elección, manteca de cerdo, Camelina sativa, nuez de semilla de mostaza, avenas, altramuz, kenaf, caléndula, cáñamo, café, linaza (lino), avellana, euforbia, semilla de calabaza, cilantro, 10 camelia, ajonjolí, cártamo, arroz, árbol de aceite de tung, cocoa, copra, ciruela, amapola, semillas de ricino, pacana, joroba, jatrofa, macadamia, nueces de Brasil, aguacate, aceite fósil o una fracción de destilado del mismo.

En varias modalidades, la composición de aceite 15 saponificado puede ser un sólido (en los que se incluyen un polvo) o un líquido. En algunas modalidades, la composición comprende además carotenoides derivados de la biomasa y/o glicerolípidos sin saponificar derivados de la biomasa y/o polisacáridos derivados de la biomasa. En algunas modalidades, 20 el aceite saponificado comprende por lo menos 50% de la masa total de la composición. En algunas modalidades, el aceite saponificado comprende por lo menos 75% de la masa total de la composición. En otras modalidades, el aceite saponificado comprende menos del 50% de la masa total de la composición. En 25 otras modalidades, el aceite saponificado comprende menos del

50% de la masa total de la composición. En algunas modalidades, los componentes derivados de la biomasa constituyen por lo menos 50% de la masa total de la composición. En algunas modalidades, los componentes derivados de la biomasa constituyen no más del 50% de la masa total de la composición.

En otro aspecto, la presente invención es concerniente con un kit que comprende una composición de aceite saponificado como se describe en la presente y un complemento oral. En algunas modalidades, el complemento oral comprende una vitamina o una hierba.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el DCW 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 DCW 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 la concentración de lípido relativa de cultivos 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 cultivos 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 por ciento de DCW de dos 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 después de la glucosa.

La Figura 6 muestra el lípido como por ciento de DCW de dos especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivadas 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 cultivadas en presencia de 2% de glucosa y 1% de glucosa + 1% de glicerol grado reactivo.

La Figura 8 muestra el lípido como por ciento de DCW de múltiples especies y cepas de *Chlorella* cuando son cultivadas en presencia de glucosa con glicilglicerol 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 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 10 muestra el DCW 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.

5 La Figura 11(a) muestra el lípido como por ciento de DCW de *Spirulina platensis* cuando son cultivados en presencia de glucosa, glicerol grado reactivo, producto secundario de glicerol de biodiesel no acidulado y una combinación de glicerol y glucosa.

10 La Figura 11(b) muestra el lípido como por ciento de DCW de *Navicula pelliculosa* cuando es cultivado en presencia de varios tipos de glicerol y en presencia de combinaciones de glicerol y glucosa.

 La Figura 12(a) muestra el lípido como por ciento de
15 DCW de *Scenedesmus armatus* cuando es cultivada en presencia de varios tipos de glicerol y en presencia de una combinación de glicerol y glucosa.

 La Figura 12(b) muestra el DCW por litro de
20 *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 DCW por litro de *Navicula pelliculosa* cuando es cultivado en presencia de varios tipos de glicerol y en presencia de una combinación de glicerol producto
25 secundario de biodiesel sin acidular y glucosa.

Las Figuras 14 (a) y (b) muestran el DCW por litro de *Scenedesmus armatus* y *Navicula pelliculosa* cuando son cultivados en presencia del glicerol producto secundario de biodiesel acidulado y sin acidular con glucosa adicional, en
5 donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

La Figura 15 muestra un efecto sinérgico de una combinación de xilosa y glucosa sobre el crecimiento de *Chlorella* en comparación con xilosa o glucosa solas.

10 La Figura 16 muestra el cultivo de *Chlorella prorothecoides* sobre glucosa y fructosa.

La Figura 17 muestra DCW por litro de *Chlorella protothecoides* cuando es cultivada en presencia de glucosa, sacarosa o una de varias muestras de melazas (designadas BS1,
15 BS2 y HTM) en presencia o ausencia de una sacarosa invertasa.

La Figura 18 muestra el cultivo de *Chlorella protothecoides* cuando es cultivada en presencia de glucosa, sacarosa o una de varias muestras de melazas (designadas BS1, BS2 y HTM) en presencia o ausencia de una sacarosa invertasa
20 tal como es medida por densidad celular relativa.

La Figura 19 muestra una comparación visual de aceite que fue extraído de hexano de la cepa UTEX 1435 en comparación con aceite de UTEX 250.

La Figura 20 muestra células de algas de alto
25 contenido de aceite embebidas en jabón.

Las Figuras 21 a-c muestran un Cladograma que compara las secuencias de ADN genómicas de 23 rARN de 8 cepas diferentes de *Chlorella protothecoides*.

Las Figuras 22-27 muestran la curva de crecimiento de 5 diferentes cepas de microalgas cultivadas en tres concentraciones diferentes de sorgo puro como la única fuente de carbono.

La Figura 28 muestra un resumen de diversidad de cadenas de lípido en especies de microalgas.

10 La Figuras 29 a-i muestran un Cladograma que compara las secuencias de ADN genómicas de rARN 23S de 23 cepas de microalgas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

Se proporcionan a continuación definiciones de ciertos términos usados en la presente por conveniencia del lector.

20 "Activo en microalgas", con referencia a un ácido nucleico, se refiere a un ácido nucleico que es funcional en microalgas. Por ejemplo, un promotor que ha sido usado para impulsar un gen de resistencia a antibiótico y partir resistencia a antibiótico a una microalga transgénica es activo en microalgas. Ejemplos de promotores activos en microalgas 25 incluyen promotores endógenos a ciertas especies de algas y

promotores encontrados en virus de plantas.

“Proteína portadora de acilo” o “ACP” es una proteína que se enlaza a una cadena de acilo creciente durante la síntesis de ácido graso como un tiol ester en el tiol distante
5 de la porción de 4’fosfopanteteína y comprende un componente del complejo de ácido graso sintasa. La frase “co-expresado naturalmente” con referencia a una proteína portadora de acilo en conjunción con una acil-ACPTioesterasa grasa significa que la ACP y la tioesterasa son co-expresadas naturalmente (por
10 naturaleza) en un tejido u organismo del cual son derivadas, por ejemplom, debido a que los genes que codifican las dos enzimas están bajo el control de una secuencia reguladora común o debido a que son expresadas en respuesta al mismo estímulo.

“Moléculas de acil-CoA” o “acil-CoA” es una molécula
15 que comprende una porción acilo anexada covalentemente a la coenzima A por medio de un enlace tiol ester en el tiol distante de la porción de 4’-fosfopanteteína de la coenzima A.

“Axénico” significa un cultivo de un organismo que está libre de contaminación por otros organismos vivientes.

20 “Biodiesel” se refiere a un ester de ácido graso producido de la transesterificación de lípido, el ester puede ser un metilester, etilester u otro ester dependiendo de los componentes de la reacción de transesterificación.

“Biomasa” se refiere al material producido por el
25 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.

“Bioreactor” significa un envolvente o envolvente
5 parcial en la cual las células, por ejemplo microorganismos, son cultivados, opcionalmente en suspensión.

“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
10 volverse parte del producto. Un catalizador incrementa así la velocidad de una reacción, después de lo cual, el catalizador puede actuar sobre otro activo para formar el producto. El catalizador disminuye en general la energía de activación global requerida para la reacción, de tal manera que la
15 reacción procede más rápidamente o a una temperatura más baja y/o un equilibrio de reacción puede ser obtenido más rápidamente. Ejemplos de catalizadores incluyen enzimas, que son catalizadores biológicos y calor que es una catalizador no biológico.

20 “Material celulósico” significa los productos de digestión de celulosa, tal como glucosa, xilosa, arabinosa, disacáridos, oligosacáridos, lignina, furfurales y otras moléculas.

“Co-cultivo” y variantes del mismo, tales como “co-
25 cultivar”, se refieren 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 microalgas cultivada con un tipo de célula diferente. Las condiciones de cultivo pueden ser
5 aquellas que reportan el crecimiento y/o propagación de los dos o más tipos de células o aquellos que facilitan el crecimiento y/o propagación de un tipo de célula o un subconjunto de los tipos de células, de los dos o más tipos de células en tanto que mantienen el crecimiento celular para el resto.

10 "Co-factor" es usado en la presente para referirse a cualquier molécula, diferente al sustrato, que es requerido para que una enzima lleve a cabo su actividad enzimática.

 "ADN complementario" ("cADN") es una copia de ADN de un mRNA, que puede ser obtenido, por ejemplo mediante
15 transcripción inversa de ARN mensajero (mARN) o amplificación (por ejemplo, vía reacción en cadena de polimerasa("PCR")).

 "Cultivado" y variantes del mismo se refieren al refuerzo intencional en crecimiento (incrementos en tamaño de células, contenido celular y/o actividad celular) y/o
20 propagación (incrementos en número de células vía mitosis) de una o más células mediante el uso de condiciones de cultivo apropiadas. La combinación tanto de cultivo como propagación pueden ser denominadas proliferación. La una o más células pueden ser aquellas de un microorganismo, tal como microalgas.
25 Ejemplos de condiciones apropiadas incluyen el uso de un medio

definido (con características conocidas tales como pH, fuerza iónica y fuente de carbono), temperatura específica, tensión de oxígeno y niveles de dióxido de carbono en un bioreactor. El término no se refiere al crecimiento o propagación de
5 microorganismos por naturaleza o de otra manera sin intervención humana directa, tal como el crecimiento natural de un organismo que finalmente es fosilizado para producir petróleo crudo geológico.

"Gen exógeno" se refiere a un ácido nucleico transformado (introducido) a una célula. Una célula transformada puede ser denominada como célula recombinante, a la cual se introducen genes exógenos adicionales. 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
15 que es transformada. En el caso de un gen homólogo, el gen introducido ocupa un sitio diferente en el genoma de la célula en relación con la copia endógena del gen o está bajo controles regulatorios diferentes del gen exógeno que reemplaza o ambos. El gen exógeno puede estar presente en más de una copia en la
20 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.

"Extraído" se refiere a aceite o lípido separado de
25 la biomasa acuosa con o sin el uso de solventes.

"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.

"Fuente de carbono fija" significa molécula(s) que
5 contiene(n) carbono comúnmente moléculas orgánicas, que están presentes a temperatura y presión ambiental en forma sólida o líquida.

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

"Heteroátomo" significa un átomo diferente a carbono o hidrógeno. Ejemplos de heteroátomos son magnesio, calcio, potasio, sodio, azufre, fósforo, hierro y cobre.

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

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

"Rendimiento de lípido incrementado" se refiere a un
20 incremento en la productividad del lípido de un cultivo microbiano, que puede ser obtenido por ejemplo al incrementar el peso seco de las células por litro de cultivo, incrementar el porcentaje de células que constituyen el lípido o
25 incrementar la cantidad global de lípido por litro de volumen

de cultivo por tiempo unitario.

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

5 "En enlace operable" se refiere a un enlace funcional entre dos secuencias de ácido nucleico, 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.

10 "In situ" significa "en el lugar" o "en su posición original". Por ejemplo, un cultivo puede contener un primer microorganismo, tal como una microalga, que segrega un catalizador y un segundo microorganismo que segrega un sustrato, en donde el primero y segundo microorganismos
15 producen los componentes necesarios para que una reacción química particular ocurra in situ en el co-cultivo sin requerir separación o procesamiento adicional de los materiales.

 "Lipasa" es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces de ester en sustratos de lípido. Las lipasas catalizan
20 la hidrólisis de lípidos a gliceroles y ácidos grasos y pueden funcionar para catalizar la transesterificación de TAG a alquilesteres de ácido graso.

 "Lípidos" son moléculas lipofílicas que pueden ser obtenidas a partir de microorganismos. Las funciones biológicas
25 principales de los lípidos incluyen almacenar energía, actuando

como componentes estructurales de membrana celulares y sirviendo como moléculas de señalización, aunque efectúan otras funciones también. Los lípidos son solubles en solventes no polares (tales como éter y cloroformo) y son relativamente insolubles en agua. Los lípidos consisten estrictamente de "colas" de hidrocarburos hidrofóbicas largas. Ejemplos de lípidos incluyen ácidos grasos (saturados e insaturados); glicéridos o glicerolípidos (tales como monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos (en los que se incluyen TAG) o grasas neutras y fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos); no glicéridos (esfingolípidos, esterol lípidos o lípidos de esterol que incluyen colesterol y hormonas esteroideas, lípidos de prenol en los que se incluyen terpenoides, ceras y poliquétidos) y derivados de lípidos complejos (lípidos azúcar-enlazados o glicolípidos y lípidos proteína-enlazados). Otros ejemplos de lípidos incluyen ácidos grasos libres; ésteres de ácidos grasos; esteroides; pigmentos (por ejemplo carotenoides y oxicarotenoides), xantófilos, fitoesteroides, ergotionina, ácido lipoico, antioxidantes en los que se incluyen beta-caroteno y tocoferol. También incluidos están los ácidos grasos poliinsaturados tales como ácido araquidónico, ácido estearidónico, colesterol, desmesterol, astaxantina, cantaxantina y ácidos grasos n-6 y n-3 altamente insaturados tales como ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico y ácido docosaheptaenoico (DHA).

Una "enzima de ruta de lípido" es una enzima involucrada en el metabolismo del lípido, esto es, ya sea la síntesis, modificación o degradación del lípido e incluye, sin limitación, lipasa, acil-ACP tioesterasas grasas y proteínas portadoras de acilo.

Una "concentración limitante de un nutriente" es una concentración de nutriente en un cultivo que limita la propagación de un organismo cultivado. Una "concentración no limitante de un nutriente" es una concentración de nutriente que puede soportar propagación máxima durante un periodo de cultivo dado. Así, el número de células producidas durante un periodo de cultivo dado es más bajo 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 a una concentración mayor que aquella que soporta la propagación máxima.

"Perfil de glicerolípido" se refiere a la distribución de diferentes longitudes de cadena de carbono y niveles de saturación de glicerolípidos en una muestra particular de biomasa. Por ejemplo, una muestra podría contener glicerolípidos en los cuales aproximadamente 60% del glicerolípido es C18:1, 20% es C18:0, 15% es C16:0 y 5% es C14:0. En donde se hace referencia a una longitud de carbono sin consideración a la saturación, tal como en "C18", tal

referencia puede incluir cualquier cantidad de saturación; por ejemplo, la biomasa microbiana que contiene 20% de lípido como C18 puede incluir C18:0, C18:1, C18:2, etc., en cantidades iguales o variables, la suma de las cuales constituyen el 20%
5 de la biomasa microbiana.

“Lisado” se refiere a una solución que contiene el contenido de células sometidas a lisis. “Someter a lisis” se refiere a someter a disrupción la membrana celular y opcionalmente pared celular de una célula, suficiente para
10 liberar por lo menos algo de contenido intracelular. “Lisis” se refiere a la ruptura de la membrana del plasma 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
15 osmóticos que comprometen su integridad.

“Microalgas” significa un organismo microbiano que es ya sea (a) eucarióntico y contiene un cloroplasto o remanente de cloroplasto o (b) una cianobacteria. Las microalgas incluyen fotoautótrofos obligados que no pueden metabolizar una fuente
20 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 se separan de células hermanas brevemente después de la división celular, tales como Chlamydomonas, también como a microbios
25 tales como por ejemplo Volvox, que es un microbio fotosintético

multisimilar simple de dos tipos de células distintas. "Microalgas" también incluye otros organismos fotosintéticos microbianos que exhiben adhesión de célula-célula tales como Agmenellum, Anabaena y Pyrobotris, también como organismos que
5 contienen estructuras semejantes a cloroplasto que ya no son aptas de efectuar fotosíntesis, tales como microalgas del género Prototheca y algunos dinoflagelados.

"Microorganismo" y "microbio" son usados intercambiablemente en la presente para referirse a organismos
10 unicelulares microscópicos.

"Aceite" significa una sustancia que contiene carbono hidrofóbica, lipofílica, no polar en los que se incluyen pero no limitados a petróleo crudo derivado geológicamente, fracciones destiladas de petróleo crudo derivado
15 geológicamente, aceite vegetal, aceite de algas y lípidos microbianos.

"Levadura oleaginosas" como se usa en la presente, significa levadura que puede acumular más de 10% de DCW como lípido. La levadura oleaginosas incluye levaduras tales como
20 Yarrowia lipolytica, también como cepas diseñadas de levadura tales como Saccharomyces cerevisiae que han sido diseñadas para acumular más del 10% de DCW como lípido.

"Choque osmótico" se refiere a la ruptura de células bacterianas, de algas u otras células en una solución en
25 seguida de una reducción repentina en presión osmótica. El

choque osmótico es algunas veces inducido a liberar componentes celulares 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, tal como en la instancia de una bolsa de polietileno o matraz de Erlenmeyer o pueden estar abiertos al medio ambiente, tal como en la instancia de una laguna a la interperie.

Una “enzima degradante de polisacárido” se refiere a una enzima apta de catalizar la hidrólisis o despolimerización de cualquier polisacárido. Por ejemplo, las celulasas son enzimas que degradan polisacárido que catalizan la hidrólisis de celulosa.

“Polisacáridos” (o “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 plantas. La celulosa puede ser despolimerizada vía 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 una abertura en el bioreactor que permite la

afluencia o efluencia de materiales tales como gases, líquidos y células. Las compuertas son usualmente conectadas a tuberías que conduce del fotobioreactor.

“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 por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico o proteína natural (que se presenta de manera estable en la naturaleza) o que la célula es derivada de una célula así modificada. Así, por ejemplo las células recombinantes expresan genes no naturales, genes no encontrados en forma natural (no recombinantes) de las células o expresan genes naturales diferentemente que la célula no recombinante, esto es, el gen natural es sobreexpresado, sub-expresado o no expresado, en relación con la expresión genética en la célula no recombinante. “Ácido nucleico recombinante” se refiere a un ácido nucleico, formado comúnmente in vitro por la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo utilizando polimerasas y endonucleasas, en una forma no encontrada en la naturaleza (y puede incluir preparaciones purificadas de ácidos nucleicos que se presentan de manera estable en la naturaleza). Así, un ácido nucleico aislado, en una forma lineal o un vector de expresión formado in vitro al ligar moléculas de ADN que no son unidas normalmente (por ejemplo para colocar dos ácidos nucleicos

diferentes en enlace operable entre sí) son recombinantes. Una vez que un ácido nucleico recombinante es introducido a una célula huésped u organismo huésped, se puede replicar de manera no recombinante, esto es, utilizando la maquinaria celular in vivo de la célula huésped; sin embargo, tales ácidos nucleicos producidos recombinantemente y subsecuentemente replicados no recombinantemente, son todavía considerados recombinantes. Similarmente, una "proteína recombinante" es una proteína fabricada utilizando técnicas recombinantes, esto es, por medio de la expresión de un ácido nucleico recombinante.

"Aceite saponificado" se refiere a las sales de ácido carboxílico y compuestos asociados que son creados durante la saponificación de esteres de ácido graso a partir de fuentes microbianas. Los esteres de ácido graso pueden ser derivados de los triacilgliceroles (TAG) producidos por microorganismos. Los compuestos asociados con aceites de fuente minerales incluyen carotenoides, tocoferoles, tocotrienoles y otros compuestos de origen biológico.

"Sonificación" se refiere a un proceso de disrupción de materiales biológicos, tales como una célula mediante el uso de energía de ondas de sonido.

"Rastrojo" se refiere a tallos y hojas secas de una cosecha restante después que el 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. Los transportadores de sacarosa, sacarosa invertasas y hexoquinasas tales como glucoquinasas y fructoquinasas son ejemplos de genes de utilización de sacarosa.

5

II. GENERAL

Ciertos microorganismos pueden ser usados para producir lípidos en grandes cantidades para uso en las industrias de combustible de transportación y petroquímicas, entre otras aplicaciones. La presente invención provee métodos que disminuyen significativamente el costo e incrementan la eficiencia de obtener lípidos y compuestos derivados de lípidos valisios de microorganismos. Microorganismos apropiados para uso en los métodos de la invención incluyen microalgas, levadura oleaginosa, hongos, bacterias y cianobacterias. Un género de microalgas para uso en la invención es la microalga que produce lípido Chlorella. La presente invención también métodos para la transesterificación in situ de triacilgliceroles (TAG) a alquilesteres de ácido graso, que son útiles como combustibles de biodiesel y/o para otras aplicaciones, también como otros métodos para modificación química de los lípidos en biomasa microbiana.

La presente invención también provee métodos para fabricación de alquilesteres de ácido graso (por ejemplo, metil esterres de ácido graso (FAME)) al cultivar una población de

25

microbios que generan por lo menos 5% de su DCW como lípido, tales como triglicéridos. En este método, la biomasa microbiana es cosechada del cultivo y opcionalmente secada para remover el agua. La transesterificación es luego llevada a cabo por la
5 adición de un alquil alcohol inferior y un catalizador (por ejemplo NaOH) para generar una fase lipofílica que contiene los alquil esteres de ácido graso y una fase hidrofílica que contiene el material celular hidrofílico. La fase lipofílica puede ser separada fácilmente de la fase hidrofílica.

10 La transesterificación directa de la biomasa, sin una etapa de proceso de separación intermedia en la cual los componentes lipofílicos son extraídos de la biomasa antes de la transesterificación, permite la producción de biodiesel a costos extensamente reducidos, en comparación con métodos que
15 emplean etapas de extracción y refinación tradicionales antes de la transesterificación.

Los métodos de la presente invención proveen ventajas adicionales en la generación de biodiesel vía la transesterificación in situ de glicerolípidos a alquilesteres
20 de ácido graso. En particular, los microbios de la presente invención pueden ser cultivados bajo condiciones que permiten la modulación del contenido de glicerolípido de las células. Sorprendentemente, se ha descubierto que una proporción mayor de glicerolípidos totales pueden ser convertidos a alquil
25 esteres de ácido graso en células que comprenden proporciones

de aceite:sin aceite incrementadamente más altas como función del DCW. Además, estas proporciones de aceite:sin aceite más altas también conducen a otra ventaja inesperada: alquil esterres de ácido graso generados de células que comprenden

5 proporciones de aceite:sin aceite incrementadamente más altas tienen una concentración más baja de heteroátomos que aquellas producidas a partir de células con proporciones de aceite: sin aceite más bajas. Los métodos proveen un contraste marcadamente con el dogma actual en el campo, es decir que el crecimiento

10 fotoautotrófico de microalgas es el mejor método de cultivo de microalgas para la producción de biocombustible (véase, por ejemplo Rodolfi, et al., *Biotechnology & Bioengineering* 102(1):100-112(2008) para discusión en cuanto a la selección de cepas de microalgas en cuanto a su productividad de biomasa y

15 contenido de lípido para cultivo en un fotobioreactor en exteriores). También se descubrió que mientras más alto es el contenido de aceites de la biomasa, más alta calidad del producto resultante después de la modificación química directa. La presente invención provee métodos heterotróficos de cultivo

20 de microbios (microalgas) para obtener un contenido de aceite más alto para la modificación química directa para la producción de productos químicos de calidad más alta.

La presente invención también provee otros métodos para modificar químicamente biomasa microbiana que contiene

25 lípidos, en los que se incluyen sin limitación hidrogenación,

interesterificación, hidroxilación, hidrólisis y saponificación. Estos métodos pueden ser usados con los varios microorganismos y condiciones de cultivo resumidos en la presente para producir una amplia variedad de productos químicos para una multitud de aplicaciones.

La presente invención también provee composiciones útiles que incluyen: una composición que comprende una fase más ligera que contienen alquil esteres de ácido graso y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana; una composición que comprende una fase más ligera que contiene lípidos completamente saturados y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana; una composición que comprende una fase más ligera que contiene lípidos y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana de más de una especie o cepa; una composición que comprende una fase más ligera que contiene lípidos hidroxilados y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana y una composición que comprende una fase más ligera que contiene ácidos grasos libres y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana. La presente invención también provee composiciones que comprenden aceite saponificado derivado de la hidrólisis alcalina de biomasa producida al cultivar una población de microorganismos.

25 **III. MICROORGANISMOS**

Los microorganismos útiles en la invención producen lípidos apropiados para modificación química para la producción de biodiesel y para producción de esteres de ácido graso para otros propósitos, tales como materias primas químicas industriales y aceites comestibles, también como la producción de otras entidades químicas. Lípidos apropiados para la producción de biodiesel y químicos incluyen TAG que contiene moléculas de ácido graso. En algunas modalidades, los ácidos grasos apropiados contienen por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 12, por lo menos 14, por lo menos 16, por lo menos 18, por lo menos 20, por lo menos 22, por lo menos 24, por lo menos 26, por lo menos 28, por lo menos 30, por lo menos 32, por lo menos 34 átomos de carbono o más. Los ácidos grasos preferidos para biodiesel contienen en general 16 y 18 átomos de carbono. En ciertas modalidades, los ácidos grasos anteriores están saturados (sin ningún doble enlace o triple enlace carbono-carbono); monoinsaturados (un solo doble enlace); poliinsaturados (dos o más dobles enlaces) son lineales (no cíclicos) y/o tienen poca o ninguna ramificación en sus estructuras.

En algunas modalidades, el cultivo de microorganismos útiles en la transesterificación in situ y métodos de modificación de la presente invención produce una biomasa que, cuando está seca comprende un contenido de aceite de por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%

o por lo menos 25%. En otras modalidades, la biomasa seca comprende un contenido de aceite de por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85% o por lo menos 90%. "Seco" o "secado", como se usa en este contexto, se refiere a la ausencia de sustancialmente toda agua. La biomasa puede también ser modificada químicamente sin ser secada; por ejemplo, la biomasa incluye una pasta celular centrifugada.

En algunas modalidades, el cultivo de microorganismos útiles en la transesterificación in situ y otros métodos de modificación químicos de la invención producen una biomasa en la cual por lo menos 10% de lípido es de C18, por lo menos 15% de lípido es de C18, por lo menos 20% de lípido es de C18 o por lo menos 25% de lípido es de C18. En otras modalidades, la biomasa comprende un constituyente de lípido que es de por lo menos 30% de C18, por lo menos 35% de C18, por lo menos 40% de C18, por lo menos 45% de C18 o por lo menos 50% de C18. En todavía otras modalidades, la biomasa puede comprender un componente de lípido que es de por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45% o por lo menos 50% de C14 y/o C16 o de longitudes de cadena más largas. Alternativamente, la biomasa puede comprender un componente de

lípidos que es de por lo menos 10% o por lo menos 20% de C14 o de longitudes de cadena más cortas.

Los microorganismos útiles en los métodos de la presente invención se pueden presentar de manera estable en la naturaleza o ser diseñados genéticamente para incrementar el rendimiento de lípidos, para generar TAG que comprenden proporciones más altas de ácidos grasos de longitud de cadena de carbono deseables (por ejemplo, C18) o para usar materias primas particulares (por ejemplo, melasas) como una fuente de energía y carbono. Tales modificaciones del diseño genético son descritas posteriormente en la presente bajo el encabezado "diseños de ruta de lípidos".

Cualquier especie de microorganismos que produzca lípidos apropiados puede ser usada en los métodos de la invención, aunque los microorganismos que producen naturalmente altos niveles de lípidos apropiados son comúnmente preferidos. Además, los microorganismos que pueden producir altos niveles de lípidos como un porcentaje de DCW cuando son sometidos a condiciones de fermentación específica son también preferidos. Las microalgas pueden ser usadas en los métodos de la invención y ejemplos no limitantes de microalgas, tanto género y especies que pueden ser usados en los métodos de la presente invención son enlistados en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de microalgas.

5 *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*, *Carteria*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros muelleri subsalsum*, *Chaetoceros sp.*, *Chlorella anitrata*, *Chlorella Antarctica*, *Chlorella aureoviridis*, *Chlorella candida*, *Chlorella capsulate*, *Chlorella desiccata*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella fusca*,
10 *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 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 reisigii*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella saccharophila var. ellipsoidea*, *Chlorella salina*, *Chlorella simplex*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella sp.*, *Chlorella sphaerica*, *Chlorella stigmatophora*, *Chlorella vanniellii*, *Chlorella vulgaris*,
20 *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 trebouxii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum infusionum*, *Chlorococcum sp.*, *Chlorogonium*, *Chroomonas sp.*, *Chrysosphaera sp.*, *Cricosphaera sp.*, *Cryptocodinium 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*,
25

5

10

15

20

25

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.,
Nitzschia 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, *Pascheria acidophila*, *Pavlova* sp., *Phagus*, *Phormidium*, *Platymonas* sp.,
Pleurochrysis carterae, *Pleurochrysis dentate*, *Pleurochrysis* sp., *Prototheca wickerhamii*,
Prototheca stagnora, *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis*, *Prototheca zopfii*,

Pyramimonas sp., *Pyrobotrys*, *Sarcinoid chrysophyte*, *Scenedesmus armatus*,
Schizochytrium, *Spirogyra*, *Spirulina platensis*, *Stichococcus* sp., *Synechococcus* sp.,
Tetraedron, *Tetraselmis* sp., *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii*, and *Viridiella*
fridericiana

Ejemplos no limitantes de levadura oleaginosa que puede ser usada en los métodos de la presente invención son enlistados en la Tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de levadura.

5

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

Ejemplos no limitantes de hongos que pueden ser
 usados en los métodos de la presente invención son enlistados
 10 en la Tabla 3.

Tabla 3. Ejemplos de hongos.

15

Mortierella, *Mortierella vinacea*, *Mortierella alpine*, *Pythium debaryanum*, *Mucor*
circinelloides, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium lilacinum*,
Hansenula, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Rhizopus*, and *Pythium*

Consideraciones que afectan la selección de un
 20 microorganismo para uso en la invención incluyen, además de la
 producción de lípidos para producción de biodiesel: (1) alto
 contenido de lípido como porcentaje de peso celular; (2)
 facilitar el crecimiento y (3) facilidad de procesamiento. Los
 microorganismos preferidos crecen heterotróficamente (sobre
 25 azúcar en ausencia de luz) o han sido diseñados para hacer

utilizando por ejemplo los métodos revelados en las solicitudes de patente estadounidense Nos 60/941,581 (presentada el 1 de Junio de 2007), 60/959, 174 (presentada el 10 de Julio de 2007), 60/968, 291 (presentada el 27 de agosto de 2007) y
5 61/024, 069 (presentada el 28 de Enero de 2008).

Condiciones de procesamiento pueden incluir, por ejemplo la disponibilidad de medios efectivos para someter a lisis las células. Las bacterias pueden también ser usadas en los métodos de invención, particularmente bacterias oleaginosas
10 tales las especies del género *Rhodococcus*, tales como *Rhodococcus opacus* y *Rhodococcus* sp.

Especies de microalgas para uso en los métodos de la invención pueden ser identificadas mediante amplificación de ciertas regiones objetivo del genoma de una microalga de
15 prueba. Por ejemplo, la identificación de una especie o cepa específica de microalgas puede ser obtenida por medio de amplificación y secuenciación de ADN nuclear y/o cloroplasto usando cebadores y metodología utilizando cualquier región del genoma (véase, por ejemplo Wu et al., Bot Bull Acad Sm (2001)
20 42 115-121 "Identification of *Chlorella* spp Isolates using ribosomal DNA sequences"). Métodos bien establecidos de análisis filogenético, tales como amplificación y secuenciación de separador transcrito interno ribosomal (ITS1 y ITS2 rADN), 23S rARN, 18S rARN y otras regiones genómicas conservadas pueden
25 ser usadas para identificar especies de microalgas y otros

organismos que producen hidrocarburos y lípidos que pueden ser usados en los métodos revelados en la presente. Para ejemplos de métodos de identificación y clasificación de algas, véase también *Genetics*, 2005 Aug, 170(4) 1601-10 wλ RNA, 2005 Apr, 11
5 (4) 361-4.

Comparaciones de ADN genómico pueden también ser usadas para identificar especies apropiadas de microalgas para uso en los métodos de la presente invención. Regiones de ADN conservado en los que se incluyen pero no limitados a ADN que
10 codifica rARN 23S, pueden ser amplificadas de especies de microalgas y comparadas con secuencia de consenso para seleccionar especies de microalgas que están relacionadas taxonómicamente con una microalga usada en un método de la presente invención. Ejemplos de tales comparaciones de
15 secuencias de ADN para especies en género *Chlorella* y *Prototheca* son mostrados a continuación en los ejemplos.

En algunas modalidades, las microalgas para uso en el método de la presente invención tienen secuencias de ADN genómicas que codifican rARN 23S que tiene por lo menos 99%,
20 por lo menos 98%, por lo menos 97%, por lo menos 96%, por lo menos 95%, por lo menos 94%, por lo menos 93%, por lo menos 92%, por lo menos 91%, por lo menos 90%, por lo menos 89%, por lo menos 88%, por lo menos 87% o por lo menos 86% de identidad de nucleótidos con por lo menos una de las secuencias en
25 enlistadas en SEQ ID Nos:3-6. En otras modalidades, microalgas

para uso en los métodos de la presente invención tienen secuencias de ADN genómico que codifican rARN 23S que tiene por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 65% o por lo menos 60% de identidad de
5 nucleótidos a por lo menos una de las secuencias enlistadas en SEQ ID Nos:3-29.

Chlorella es un género de algas verdes de una sola célula, pertenecientes al filo Chlorophyta, que pueden ser usados en los métodos de la presente invención. Chlorella es de
10 forma esférica, de aproximadamente 2 a 10 micras 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 a su alta composición de lípido,
15 particularmente lípido de cadena larga apropiado para biodiesel y modificación química a otras moléculas. Además, esta microalga crece heterotróficamente.

Prototheca es un género de una microalga de una sola célula que se consideraba que era un mutante no fotosintético
20 de Chlorella que es útil a los métodos de la presente invención. En tanto que Chlorella puede obtener su energía por medio de fotosíntesis, las especies del género Prototheca son heterótrofos obligados. Prototheca son de forma esférica de aproximadamente 2 a 15 micras de diámetro y sin flagelos.
25 Prototheca, particularmente moriformis preferido para uso en la

invención debido a su composición de lípido, particularmente lípidos saturados apropiados para saponificación. Además, el lípido extraído de éstas microalgas tiene muy pocos contaminantes colgantes, haciéndolo además apropiado para saponificación.

Ya que tanto con plantas como animales, las algas y otros microbios almacenan energía en exceso en forma de lípidos para uso cuando otras fuentes de energía (por ejemplo, luz solar) no están disponibles. Además, la moderación del contenido de aceite permite a las algas vivir en un medio ambiente acuoso para flotar y mediante esto optimizar el acceso a la luz del sol para llevar a cabo los procesos fotosintéticos. La habilidad para modificar la capacidad de flotación vía moderación del contenido de aceite ha conducido a las células de microalgas que pueden generar altas concentraciones de aceite celular en comparación con las plantas superiores. La característica de alto contenido de aceite es ventajoso para la modificación química in situ de biomasa portadora de aceite, debido a que, como se demuestra en la presente, la biomasa de alto contenido de aceite produce derivados de TAG de pureza más alta en comparación con la biomasa de bajo contenido de aceite, particularmente biomasa de bajo contenido de aceite derivada fotosintéticamente. Así, los microorganismos que pueden ser usados para generar biomasa de alto contenido de aceite son preferidos para uso de los métodos

de la presente invención.

A. MÉTODOS DE CULTIVO

Los microorganismos pueden ser cultivados tanto para
5 propósitos de llevar a cabo manipulaciones genéticas opcionales
y para la producción de lípidos. El primer tipo de cultivo se
lleva a cabo a una escala pequeña y por lo menos inicialmente,
bajo condiciones en las cuales el microorganismo de partida
puede crecer. Por ejemplo, si el microorganismo de partida es
10 un fotoautótrofo, el cultivo inicial se lleva a cabo en
presencia de luz. Las condiciones de cultivo pueden ser
cambiadas si el microorganismo es evolucionado o diseñado para
crecer independientemente de la luz. El cultivo por propósitos
de producción de lípidos se lleva a cabo usualmente a una
15 escala grande.

1. MÉTODOS DE CULTIVO FOTOSINTÉTICOS

Los microorganismos fotosintéticos, tales como
microalgas, pueden ser cultivados en presencia de luz y un
20 medio de cultivo líquido que puede estar contenido, por ejemplo
en un fotobioreactor. 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
25 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 de luz de día y bajo luz artificial durante horas de la noche.

El contenido de gas de un fotobioreactor para cultivar microorganismos tales como microalgas pueden ser manipulados. Parte del volumen de un fotobioreactor puede contener gas en lugar de líquido. Se pueden usar entradas de gas para bombear gases al fotobioreactor. Cualquier gas puede ser bombeado a un fotobioreactor, en los que se incluyen aire, mezclas de aire/CO₂, gases nobles tales como argón y otros gases. 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 pueden también afectar la turbidez de un cultivo a una velocidad de flujo dada. Las mezclas de aire/CO₂ pueden ser moduladas para generar cantidades óptimas de CO₂ para el crecimiento máximo por un organismo particular. Las microalgas crecen significativamente más rápido en la luz bajo por ejemplo, 3% de CO₂/97% de aire que en 100% de aire. El 3% de CO₂/97% de aire tiene aproximadamente 100 veces más de CO₂ que aire. Por ejemplo, las mezclas de aire:CO₂ de aproximadamente 99.75% de aire:0.25% de CO₂, aproximadamente

99.5% de aire:0.5% de CO₂, aproximadamente 99.0% de aire: 1.00% de CO₂, aproximadamente 98.0% de aire:2.0% de CO₂, aproximadamente 97.0% de aire:3.0% de CO₂, aproximadamente 96.0% de aire:4.0% de CO₂, y aproximadamente 95.00% de
 5 aire:5.0% de CO₂, puede ser infundido a un bioreactor o fotobioreactor de acuerdo con los métodos presentes. Una mezcla de 5% de CO₂:95% de aire sometida a infusión a un fotobioreactor que contiene células *Botryococcus* es reportado en JAgnc Food Chem 2006 Jun 28,54(13) 4593-9, J Biosci Bweng
 10 1999,87(6) 811-5, and J Nat Prod 2003 Jun,66(6) 772-8).

Las microalgas pueden ser cultivadas y mantenidas en fotobioreactores cerrados fabricados de cualquiera de una variedad de tipos diferentes de material transparente o semitransparente. Tal material incluye recintos de Plexigas®,
 15 recintos de vidrio, bolsas fabricadas de sustancias tales como polietileno, tubos transparentes o semitransparentes y otros materiales. Las microalgas pueden también ser cultivadas y mantenidas en fotobioreactores abiertos tales como lagunas de charola, lagunas de aislamiento y otros recipientes no
 20 cerrados.

"Sombreado de algas" se refiere a la incapacidad de una fuente de luz para penetrar y llegar a todas las células de un cultivo fotosintético. Las células más cercanas a la fuente de luz "sombrearán" (en virtud de su presencia física y
 25 absorción de fotones en los cloroplastos) aquellas células

alejadas de la fuente de luz y mediante esto limitan la exposición de estas otras células a la energía necesaria para convertir la materia prima de carbono a lípidos u otros materiales necesarios para el crecimiento y reproducción de las células. Al mezclar el cultivo, se puede proveer un mecanismo para exponer todas las células a la fuente de luz, sin embargo, el "sombreado" impacta no obstante la duración total de exposición, conduciendo a un crecimiento más lento y un contenido de aceite más bajo como porcentaje de DCW. Como resultado, periodos de cultivo más largos pueden ser requeridos para obtener altas densidades de células y/o alto contenido de aceites. Aún después de periodos extensos de cultivo, las células cultivadas en la luz como la única fuente de energía raramente contienen más de 15% de aceite como porcentaje de DCW. Además, el crecimiento fotosintético de microalgas da como resultado altos niveles de clorofila en la biomasa, conduciendo a cantidades mucho más altas de magnesio en biomasa directamente transesterificada, debido a que el magnesio es un componente de clorofila y la clorofila es un componente altamente hidrofóbico que se acumula en la fase lipofílica. Además, los niveles de carotenoides más altos se acumulan en algas cultivadas fotosintéticamente que en algas cultivadas heterotróficamente.

25 **2. MÉTODOS DE CULTIVO HETEROTRÓFICOS PARA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS**

En contraste con los métodos de cultivo fotosintéticos, las microalgas pueden ser cultivadas en medios líquidos con el cultivo contenido en un bioreactor que no permite que la luz entre. Los métodos de cultivo heterotrófico
 5 tales como éstos dependen del uso de una fuente de carbono fija (por ejemplo, glucosa, glicerol, celulósicos, etc.) para proveer energía para el crecimiento y producción de lípidos. Los parámetros de condición de cultivos pueden ser manipulados para optimizar la producción total del lípido.

10 Los medios de cultivo de microalgas contienen comúnmente componentes tales como fuente de nitrógeno fijo, elementos en trazas, opcionalmente una solución reguladora de pH para el mantenimiento del pH y fosfato. Otros componentes pueden incluir una fuente de carbono fija tal como acetato o
 15 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, sus formas respectivas de ZnCl_2 , H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $(\text{NH}_4)_5\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Estos y otros
 20 parámetros de cultivo, tales como el pH del medio de cultivo, la identidad de concentración de elementos de trazas y otros medios constituyentes, pueden también ser manipulados en el método de la invención para obtener un resultado de producción deseado.

25 Para organismos aptos de crecer en una fuente de

carbono fija, la fuente de carbono fija puede ser por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, xilosa, manosa, ramnosa, glicerol, fuentes celulósicas y/o fluoridoside. La una o más fuente(s) de carbono puede(n) ser suministrada(s) a una
5 concentración de por lo menos aproximadamente 50 μ M, por lo menos aproximadamente 100 μ M, por lo menos aproximadamente 500 μ M, por lo menos aproximadamente 5 mM, por lo menos aproximadamente 50 mM y por lo menos aproximadamente 500 mM de una o más fuente(s) de carbono fija(s) provista(s)
10 exógenamente. Para múltiples especies de Chlorella, por ejemplo, el cultivo heterotrófico da como resultado alta producción de biomasa y acumulación de alto contenido de lípidos en las células.

Para producción de lípidos, las células, en las que
15 se incluyen células recombinantes, son cultivadas o fermentadas comúnmente en grandes cantidades. El cultivo puede tomar lugar en grandes volúmenes de líquido tales como en cultivos de suspensión como ejemplo. Otros ejemplos incluyen partir con un pequeño cultivo de células que es expandido a una biomasa
20 grande mediante crecimiento celular y propagación concurrentemente con producción de lípido. Los 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 es apropiado, como lo son los
25 fermentadores muy grandes usados en la producción de etanol.

Fuentes de nutriente apropiadas para cultivo en un fermentador son provistas. En estas se incluyen materias primas tales como una o más de las siguientes: una fuente de carbono fija tal como glucosa, almidón de maíz, celulosa despolimerizada, sacarosa, caña de azúcar, remolacha de azúcar, lactosa, suero de leche o melasas; una fuente de grasa, tales como grasas o aceites vegetales; una fuente de nitrógeno tal como proteína, harina de soya, licor de agua de maceración, 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 condiciones de cultivo tales como temperatura, pH, tensión de oxígeno y niveles de dióxido de carbono. Componentes gaseosos, como oxígeno o nitrógeno pueden ser burbujeados a través de un cultivo líquido.

Un fermentador puede ser usado para permitir que las células sufran las varias fases de su ciclo de crecimiento. Como un ejemplo, un inóculo de células que producen lípido puede ser introducido a un medio seguido por un periodo de retraso (fase de retardo) antes de que las células comiencen a crecer. En seguida del periodo de retardo, la velocidad de crecimiento se incrementa rápidamente y entra a la fase logarítmica o exponencial. La fase exponencial es seguida comúnmente por un frenado o cese completo de división celular debido a disminuciones en nutrientes, nitrógeno en particular.

Después del frenado, el crecimiento se detiene y las células entran a un estado estable de convertir una materia prima de carbono fija a un producto deseado, tal como un TAG. El mantenimiento del estado estable por un periodo de tiempo más largo da como resultado o un porcentaje más alto de DCW que es el producto deseado, tal como lípido en el caso de los microorganismos descritos en la presente. En algunas instancias, es deseable mantener las células microbianas en un estado estable en el cual las células convierten un carbohidrato tal como glucosa a lípido, en tanto que no sufren división celular por un periodo de tiempo extenso para generar biomasa microbiana cuando más del 30%, más del 40%, más del 50% o más del 60% de lípido como porcentaje del peso de las células seco. La limitación de nitrógeno es en general suficiente para impedir que las células sufran división celular.

Los microorganismos cultivados utilizando condiciones descritas en la presente y conocidas en el arte puede comprender por lo menos 20% en peso del lípido, preferiblemente por lo menos 40% en peso de lípido, más preferiblemente por lo menos 50% en peso de lípido, más preferiblemente por lo menos 60% en peso de lípido, más preferiblemente por lo menos 70% en peso de lípido y más preferiblemente por lo menos 80% en peso de lípido. En algunas modalidades, los microorganismos son cultivados utilizando condiciones descritas en la presente para obtener un componente de lípido de por lo menos 20% en peso

dentro de un periodo de cultivo de no más una semana. En algunas modalidades, el periodo de cultivo no es de más de 14 días, no más de 13 días, no más de 12 días, no más de 11 días, no más de 10, no más de 9, no más de 8 días, no más de 6 días, no más de 5 días, no más de 4 días o no más de 3 días. En cualquiera de los periodos de cultivo anteriores, los microorganismos pueden producir por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85% o por lo menos 90% de lípido en DCW. En algunas modalidades, los microorganismos son cultivados utilizando condiciones descritas en la presente para obtener un componente de lípido de por lo menos 20% en peso dentro de un periodo de cultivo de por lo menos 2 días. En algunas modalidades, el periodo de cultivo es de por lo menos 3 días, por lo menos 4 días, por lo menos 5 días, por lo menos 6 días, por lo menos 7 días o por lo menos 8 días. En cualquiera de los periodos de cultivo anteriores los microorganismos pueden producir por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85% o por lo menos 90% de lípido en DCW.

Las condiciones de proceso pueden ser ajustadas para

incrementar el rendimiento de lípidos apropiada para uso como biodiesel u otras moléculas objetivo y/o reducir el costo de producción. Por ejemplo, en ciertas modalidades, un microbio (por ejemplo, una microalga) es cultivado en presencia de una
5 concentración limitante de uno o más nutrientes, tal como por ejemplo nitrógeno. Esta condición tiende a incrementar el rendimiento de lípido microbiano con respecto al rendimiento de lípido microbiano en un cultivo en el cual el nitrógeno es provisto en exceso. En modalidades particulares, el incremento
10 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 del material por una porción del periodo de cultivo total o por todo el periodo. En modalidades particulares, la
15 concentración de nutrientes es sometida a ciclos entre una concentración limitante y una concentración no limitante por lo menos dos veces durante el periodo de cultivo total. Además y como se muestra en las figuras, ciertas materias primas de carbono fijo tales como glicerol pueden ser empleadas para
20 incrementar el porcentaje de peso celular que es de lípido en comparación con cantidades comparables de otras materias primas de carbono fijas.

Para incrementar el rendimiento del lípido, se puede enfriar ácido acético en la materia prima para un microbio que
25 produce lípido (por ejemplo, una microalga). El ácido acético

se alimenta directamente al punto de metabolismo que inicia la síntesis de ácido graso (esto es, acetil-CoA); proporcionando así, la producción de ácido acético en el cultivo incrementar la producción de ácido graso. En general, en esta modalidad, el
5 microbio es cultivado en presencia de una cantidad suficiente de ácido acético para incrementar el rendimiento del lípido microbiano y/o rendimiento de ácido graso microbiano, específicamente con respecto al rendimiento del lípido microbiano (por ejemplo, ácido graso) en ausencia de ácido
10 acético.

En otra modalidad, el rendimiento del lípido es incrementado al cultivar un microbio que produce lípido (por ejemplo, microalgas) en presencia de uno o más co-factores para una enzima de ruta de lípido (por ejemplo, enzima sintética de
15 ácido graso). En general, en esta modalidad, la concentración del co-factor es suficiente para incrementar el rendimiento del lípido microbiano (por ejemplo, ácido graso) con respecto al rendimiento del lípido global en ausencia del co-factor. En una modalidad particular, el co-factor es provisto al cultivo al
20 incluir en el cultivo un microbio (por ejemplo, microalga) que contiene un gen exógeno que codifica el (los) co-factor(es). Alternativamente el (los) co-factor(es) puede(n) ser provisto(s) a un cultivo al incluir un microbio (por ejemplo, microalga) que contiene un gen exógeno que codifica una
25 proteína que participa en la síntesis del co-factor. En ciertas

modalidades los co-factores apropiados incluyen cualquier vitamina requerida por una enzima de ruta de lípido, tal como por ejemplo biotina o pantotenato. Los genes que codifican 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 constructos y técnicas conocidos para aquellos experimentados en el arte.

La biomasa de microalgas con un alto porcentaje de acumulación de aceite/lípido en peso seco ha sido generada utilizando una variedad de métodos diferentes de cultivos conocidos en el arte. La biomasa de microalgas con un porcentaje más alto de aceite/lípido acumulado es útil de acuerdo con la presente invención. Li et al describe cultivos de *Chlorella vulgaris* con hasta 56.6% de lípido en DCW en cultivos estacionarios cultivados bajo condiciones autotróficas (esto es, condiciones de cultivo fotosintéticas) utilizando altas concentraciones de hierro (Li et al., *Bioresource Technology* 99(11):4717-22 (2008)). Rodolfi et al., describe en cultivos de *Nanochloropsis* sp. y *Chaetoceros calcitrans* con 60% de lípido en DCW y 39.8% de lípido en DCW, respectivamente, cultivados en un fotobioreactor bajo condiciones de inanición de nitrógeno (Rodolfi et al., *Biotechnology & Bioengineering* 102(1):100-112 (2008)). Solovchenko et al. Describen cultivos de *Parietochloris incise* con aproximadamente 30% de acumulación

de lípido (DCW) cuando son cultivados fototróficamente y bajo condiciones de bajo nitrógeno (Solovchenko et al , Journal of Applied Phcology 20:245-251 (2008)). Chlorella protothecoides puede producir hasta 55% de lípido (DCW) bajo ciertas

5 condiciones heterotróficas con inanición de nitrógeno (Miao and Wu, Bioresource Technology 97:841-846 (2006)). Otra especie de Chlorella en la que se incluyen Chlorella emersonu, Chlorella sorokimana y Chlorella minutissima han sido descritas que han acumulado hasta 63% de aceite (DCW) cuando son cultivados en

10 bioreactores de tanque agitado bajo condiciones de medio de bajo contenido de nitrógeno ((Illman et al , Enzyme and Microbial Technology 27:631-635 (2000)). Todavía un porciento de acumulación de lípido más alta en DCW ha sido reportada, en la que se incluyen 70% de acumulación de lípido (DCW) en

15 cultivos de Dumaliella tertiolecta cultivados en condiciones de NaCl incrementadas (Takagi et al , Journal ofBiosaence and Bioengineenng 101(3) 223-226 (2006)) y 75% de acumulación de lípido en cultivos de Botryococcus braunii (Banerjee et al , Critical Reviews in Biotechnology 22(3) 245-279 (2002)). Estos

20 y métodos similares pueden ser usados para el cultivo fotosintético y heterotrófico de microalgas para producir aceites.

La biomasa de microalgas generada por los métodos de cultivo descritos en la presente y útiles de acuerdo con la

25 presente invención comprenden por lo menos 10% de aceite de

microalgas en peso seco. En algunas modalidades, la biomasa de microalgas comprende por lo menos 15%, por lo menos 25%, por lo menos 35%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55% o por lo menos 60% de aceite de microalgas en peso seco. En algunas modalidades, la biomasa de microalgas contiene de 10-90% de aceite de microalgas, de 25-75% de aceite de microalgas, de 40-75% de aceite de microalgas o de 50-70% de aceite de microalgas en peso seco.

En varias modalidades, la biomasa de microalgas comprende por lo menos 25%, por lo menos 26%, por lo menos 27%, por lo menos 28%, por lo menos 29%, por lo menos 30%, por lo menos 31%, por lo menos 32%, por lo menos 33%, por lo menos 34%, por lo menos 35%, por lo menos 36%, por lo menos 37%, por lo menos 38%, por lo menos 39%, por lo menos 40%, por lo menos 41%, por lo menos 42%, por lo menos 43%, por lo menos 44%, por lo menos 45%, por lo menos 46%, por lo menos 47%, por lo menos 48%, por lo menos 49% o por lo menos 50% de aceite de microalgas en peso seco. En otras modalidades, la biomasa de microalgas comprende por lo menos 51%, por lo menos 52%, por lo menos 53%, por lo menos 54%, por lo menos 55%, por lo menos 56%, por lo menos 57%, por lo menos 58%, por lo menos 59%, por lo menos 60%, por lo menos 61%, por lo menos 62%, por lo menos 63%, por lo menos 64%, por lo menos 65%, por lo menos 66%, por lo menos 67%, por lo menos 68%, por lo menos 69%, por lo menos 70%, por lo menos 71%, por lo menos 72%, por lo menos 73%, por

lo menos 74%, por lo menos 75%, por lo menos 76%, por lo menos 77%, por lo menos 78%, por lo menos 79%, por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por
5 lo menos 88%, por lo menos 89% o por lo menos 90% de aceite de microalgas en peso seco.

a. USO DE FUENTES DE CARBONO NO TRADICIONALES

Los microorganismos pueden crecer naturalmente sobre
10 o diseñados para crecer sobre fuentes de carbono no tradicionales, tales como sacarosa, xilosa, materiales celulósicos, jarabe de sorgo y materiales de desperdicio. Materiales celulósicos apropiados incluyen residuos de cosechas de energía herbáceas y de madera, también como cosechas
15 agrícolas, esto es, las partes de plantas, tallos y hojas principalmente, que no son el producto de elemento o fibra principal. Ejemplos incluyen desperdicios agrícolas tales como bagazo de caña de azúcar, vainas de arroz, fibra de maíz (incluyendo tallos, hojas, cáscaras y mazorcas), paja de trigo,
20 paja de arroz, pulpa de remolacha de azúcar, pulpa de cítricos, cáscaras de cítricos, desperdicios forestales tales como madera dura y recortes de madera blanda y residuos de madera blanda y madera dura de operaciones de maderamen o maderaje, desperdicios de madera tales como desperdicio de aserradero
25 (fragmentos de madera, aserrín) y desperdicio de aserradero;

desperdicios urbanos tales como fracciones de papel de desperdicio sólido municipal, desperdicio de madera urbano y desperdicio verde urbano tales recortes de césped municipal y desperdicio de construcción de madera. Materiales celulósicos
5 adicionales incluyen cosechas celulósicas dedicadas tales como pasto varilla, madera de álamo híbrido y pasto elefante, caña de fibra y fibra de sorgo. Los azúcares de cinco carbonos que son producidos a partir de tales materiales incluyen xilosa.

En otro método de cultivo heterotrófico, la especie
10 de microalgas puede utilizar fuentes de carbono mezcladas tales como jarabe de sorgo o sorgo puro. El jarabe de sorgo es producido a partir del jugo de caña de sorgo dulce. Su perfil de azúcar consiste de principalmente glucosa (dextrosa), fructosa y sacarosa. Las cepas de microalgas pueden ser
15 seleccionadas en cuanto a la capacidad para utilizar sorgos como la única fuente de carbono. Como ejemplos no limitantes, las microalgas de varias cepas de *Chlorella protothecoides*, *Chlorella luteoviridis*, *Prototheca moniformis*, *Chlorella kesslen*, *Parachlorella kesslen* y *Prototheca stagnora* pueden utilizar
20 jarabe de sorgo en condiciones heterotróficas, como se describe en los ejemplos a continuación.

Algunos microorganismos crecen naturalmente o pueden ser diseñados para crecer sobre una fuente de carbono fija que es una fuente heterogénea de compuestos, tales como desperdicio
25 municipal, aguas cloacales tratadas secundariamente, aguas de

desperdicio y otras fuentes de carbono fijo y otros nutrientes tales como sulfatos, fosfatos y nitratos. El componente de aguas cloacales sirve como una fuente de nutriente en la producción de lípidos y el cultivo proporciona una fuente no
5 cara de lípidos para la transesterificación in situ y la producción de biodiesel o para modificación técnica de acuerdo con los métodos de la invención.

Para reducir el costo de producir biodiesel u otro lípidos modificados químicamente, glicerol crudo, parcialmente
10 purificado o purificado producido como un producto secundario de transesterificación de lípido puede ser empleado como materia prima para la fermentación, por ejemplo cultivos de microbios que producen lípidos. Así, la invención provee métodos que involucran las etapas de cultivar un microbio (por
15 ejemplo, microalgas) en un primer cultivo microbiano; someter la biomasa microbiana a transesterificación para producir ester(es) de ácido graso y glicerol, como se describe posteriormente en la presente y agregar el glicerol a un segundo cultivo microbiano como materia prima. Los primeros y segundos cultivos
20 microbianos pueden ser pero no necesitan ser cultivos del mismo microbio. Si se desea, un sistema continuo puede ser implementado de acuerdo con la invención, mediante la cual el glicerol producido del lípido recuperado de un cultivo puede ser retroalimentado al mismo cultivo.

25 Parámetros de cultivo mejorados incorporan el uso de

glicerol para fermentación de múltiples géneros tanto de microbios eucarióticos como procarióticos, en los que se incluyen microbios de los géneros *Chlorella*, *Navicula*, *Scenedesmus* and *Spiruhna*, como se describe en la presente. Como
5 los ejemplos demuestran, microbios de linaje evolucionario extremadamente divergente, en los que se incluyen *Chlorella*, *Navicula*, *Scenedesmus* and *Spiruhna*, también como cultivos de múltiples especies de *Chlorella* distintas crecen muy bien sobre no solamente glicerol grado reactivo purificado, sino también
10 en productos secundarios de glicerol acidulado y sin acidular de la transesterificación de biodiesel. En algunas instancias, microalgas tales como las cepas *Chlorella* sufren división celular más rápido en presencia de glicerol que en presencia de glucosa.

15 Los métodos de la presente invención pueden utilizar microorganismos, por ejemplo, cultivados vía proceso de cultivo de dos etapas, en los cuales las células son primero alimentadas con glicerol para incrementar la densidad celular rápidamente y luego son alimentadas con glucosa para acumular
20 lípidos. Esto puede proveer beneficios económicos significativos en que el producto secundario de glicerol del proceso de transesterificación es puesto de regreso al proceso de producción. Otros métodos de alimentación son provistos también, tales como métodos en los cuales mezclas de glicerol
25 y glucosa son alimentadas y métodos en los cuales la glucosa es

alimentada durante la fase de crecimiento y el glicerol es alimentado durante la fase de producción de lípido. La alimentación de tales mezclas puede proveer beneficio económico. Además, los métodos de la presente invención
5 incluyen métodos en los cuales los microorganismos son alimentados alternativamente con azúcares tales como sacarosa en varias combinaciones con glicerol. Estas alternativas han sido demostradas con microbios de linaje evolucionario extremadamente divergente, en los que se incluyen tanto
10 procariontes como eucariontes, demostrando la actividad de estas condiciones de cultivo alternativas para la fermentación microbiana de acuerdo con los métodos de la presente invención.

Múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas en una especie de *Chlorella*, se desempeñan mejor en presencia del
15 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
20 las cepas de *Chlorella protothecoides* y *Chlorella kessleri* exhiben mejor productividad sobre productos secundarios de glicerol acidulado y sin acidular de la transesterificación de biodiesel que cuando son cultivados sobre glicerol grado reactivo puro. Otros microbios, tales como microalgas de
25 *Scenedesmus* and *Navicula* microalgae, se pueden también

desempeñar mejor en presencia de productos secundarios de glicerol de la transesterificación que una cantidad equivalente de glicerol grado reactivo.

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

Las Figuras 3 y 4 demuestran que, con múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie *Chlorella*, los niveles de lípido (o contenido de lípido) por litro son más altos cuando las células son cultivadas en presencia del producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro.

Las Figuras 5 y 6 demuestran que múltiples especies de *Chlorella* y múltiples cepas dentro de una especie de

Chlorella acumulan un porcentaje más alto de DCW como lípido (lípido como un porcentaje de peso celular) cuando son cultivados en presencia del producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando son cultivados en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro. La Figura 11 demuestra que tanto como Spirulina platensis como Navicula pelliculosa pueden acumular un porcentaje más alto de DCW 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 12 (a) demuestra que Scenedesmus armatus puede acumular un porcentaje más alto de DCW como lípido cuando es cultivada en presencia del producto secundario de glicerol de biodiesel que cuando es cultivada en presencia de concentraciones equivalentes de glicerol grado reactivo puro.

Además, múltiples especies de microbios, en los que se incluyen microalgas tales como Chlorella 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. Así, la Figura 7 demuestra que Chlorella puede acumular niveles de lípido más alto (contenido) por litro de cultivo en presencia de 1% de glicerol/1% de glucosa que en presencia de 2% de glucosa. La Figura 12 (b) demuestra que el DCW por litro de Scenedesmus

armatus es más alto cuando es cultivada en presencia de 1% de glicerol producto secundario de biodiesel/1% de glucosa que en presencia de 2% de glucosa. La Figura 13 demuestra que el DCW por litro de *Navicula pelliculosa* es más alto cuando es
5 cultivado en presencia de 1% de glicerol producto secundario de biodiesel/1% de glucosa que en presencia de 2% de glucosa.

La Figura 8 demuestra que *Chlorella* puede acumular un porcentaje más alto de DCW como lípido cuando es cultivada en presencia de una mezcla de igual concentración (por cierto en
10 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 DCW como lípido cuando es cultivada en presencia de una mezcla de igual concentración (por ciento en peso) de glicerol
15 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 DCW como lípido cuando es cultivada en presencia de una mezcla de igual concentración (por ciento en peso) de
20 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 DCW como lípido cuando es cultivada en presencia de
25 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. Tales métodos para incrementar el lípido con porcentaje de DCW son útiles en la generación de biomasa que produce una cantidad más baja de heteroátomos en biodiesel que el porcentaje más bajo de biomasa de lípido cuando la biomasa es sometida a transesterificación directa.

Se ha descubierto además que, al agregar glicerol y glucosa a los microbios, en los que se incluyen microalgas tales como *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Navicula* secuencialmente, en lugar de que como una sola mezcla por lotes de glicerol y glucosa, se pueden 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 y glicerol grado reactivo.

Así, la Figura 8 demuestra que *Chlorella* puede acumular un porcentaje más alto de DCW como lípido cuando el glicerol es agregado a un cultivo por un primer periodo de tiempo, seguido por la adición de glucosa y cultivo proseguido por un segundo periodo de tiempo, que cuando las mismas cantidades de glicerol y glucosa son agregadas conjuntamente al comienzo del experimento. Tales métodos para incrementar el lípido como porcentaje de DCW son útiles para generar biomasa que produce una cantidad más baja de heteroátomos en biodiesel

u otros productos que disminuyen el porcentaje de biomasa de
lípidos cuando la biomasa es sometida a transesterificación
directa u otros métodos de modificación química. La Figura 9
muestra que *Chlorella* exhibe niveles de lípidos más altos
5 (contenido) por litro de cultivo cuando glicerol y glucosa son
agregados secuencialmente que con las mismas cantidades de
glicerol y glucosa son agregadas conjuntamente al comienzo del
cultivo. Esta tendencia fue observada cuando el glicerol
producto secundario de biodiesel acidulado, glicerol producto
10 secundario de biodiesel sin acidular o glicerol grado reactivo
fue utilizado.

La Figura 10 demuestra cuatro cepas de *Chlorella* de
dos especies diferentes que acumulan DCW más alto por litro de
cultivo cuando glicerol y glucosa son agregados secuencialmente
15 que cuando las mismas cantidades de glicerol y glucosa son
agregados conjuntamente al comienzo del experimento. Esta
tendencia fue observada cuando el glicerol producto secundario
de biodiesel acidulado, glicerol producto secundario biodiesel
sin acidural o glicerol grado reactivo fue utilizado. La Figura
20 14 (a) y (b) demuestran que tanto *Scenedesmus armatus* como
Navicula pelliculosa pueden exhibir incrementos en DCW por
litro cuando el glicerol producto secundario de biodiesel
solamente es agregado a un cultivo por un primer periodo de
tiempo, seguido posteriormente por la adición de glucosa, en
25 comparación con la adición de cantidades idénticas de glicerol

y glucosa al comienzo de la fermentación.

Así, tres marcadores diferentes de productividad (DCW por litro, gramos por litro de lípido y porcentaje de DCW como lípido) en la producción de lípido microbiano son mejorados por el uso de producto secundario de biodiesel y la separación temporal de las fuentes de carbono.

El costo de producir biodiesel u otros lípidos modificados químicamente puede también ser reducido al utilizar biomasa celulósica como materia prima. La biomasa celulósica (por ejemplo, rastrojo, tal como rastrojo de maíz) es no cara y fácilmente disponible; sin embargo, intentos por usar este material como materia prima para levadura han fracasado. En particular, se ha encontrado que tales materias primas son inhibidoras 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 hemi-celulosa). En contraste, las microalgas pueden crecer en material celulósico procesado. Así, la invención provee un método para cultivar microalgas en presencia de un material celulósico y/o un azúcar de cinco carbonos para la producción de lípidos que pueden ser transesterificados de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Los materiales celulósicos incluyen en general celulosa (40-60% en peso seco); hemi-celulosa (20-40% peso seco) y lignina (10-30% de peso seco).

Sorprendentemente, *Chlorella protothecoides* puede

exhibir niveles más altos de productividad cuando es cultivada sobre una combinación de glucosa y xilosa que cuando es cultivada ya sea sobre glucosa o xilosa sola. Este efecto sinérgico proporciona una ventaja significativa en que
5 permite el cultivo de *Chlorella* o combinaciones de xilosa y glucosa, tal como material celulósico, como se muestra en la Figura 15.

Los ejemplos específicos de condiciones de proceso para incrementar el rendimiento de lípidos apropiados para uso
10 como biodiesel y/o para reducir el costo de producción pueden ser usados individualmente, como se describe anteriormente o en combinación. Además, la invención incluye la selección y/o diseño genético de microbios, tales como microalgas para producir microbios que son aun más apropiados para uso en los
15 métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, el uso de microbios que tienen una habilidad mayor para utilizar cualquiera de las materias primas descritas anteriormente para la proliferación incrementada y/o producción de lípidos están dentro del alcance de los métodos de la invención.

20 El costo de producción de biodiesel u otros lípidos modificados químicamente puede también ser reducido al utilizar sacarosa como materia prima, en las que se incluyen sacarosa producida por ejemplo a partir de caña de azúcar. Los métodos de la invención incluyen el uso de especies diseñadas de
25 *Chlorella* que pueden utilizar sacarosa como fuente de carbono.

Por ejemplo, la expresión de un transportador de sacarosa y una invertasa sacarosa permite que *Chlorella* transporte sacarosa a la células del medio de cultivo e hidrolice sacarosa para producir glucosa y fructosa. Opcionalmente, una fructocinasa
5 puede ser expresada también en distancias en donde la actividad de exocinasa endógena es insuficiente para la fosforilación máxima de fructosa. Ejemplos de transportadores de sacarosa apropiados incluyen aquellos descritos bajo los números de acceso de Genbank CAD91334, CAB92307 y CAA53390. Ejemplos de
10 sacarosas invertasas incluyen aquellas descritas bajo los números de acceso de Genbank CAB95010, NPJ_12104 y CAA06839. Ejemplos de frucocinasas apropiadas incluyen aquellas descritas bajo los números de acceso de Genbank P26984, P26420 y CAA43322. Vectores para transformación de microalgas, en las
15 que se incluyen *Chlorella*, que codifican uno o más de tales genes pueden ser diseñados como se describe en, por ejemplo publicación internacional número WO2008/151149.

Las secreción de una sacarosa invertasa puede eliminar la necesidad de expresión de un transportador que
20 puede transportar sacarosa a la célula. Esto es debido a que una invertasa secretada cataliza la conversión de una molécula de sacarosa a una molécula de glucosa y una molécula de fructosa, ambas de las cuales pueden ser transportadas y utilizadas por los microbios revelados en la presente. La
25 expresión de una sacarosa invertasa una señal de secreción

genera actividad de invertasa al exterior de la célula. Véase Hawkins et al., Current Microbiology Vol 38 (1999), páginas 335-341, para ejemplos de señales de secreción activas en *Chlorella*. La expresión de tal proteína permite que las células
5 ya aptas de utilizar glucosa extracelular como fuente de energía utilicen sacarosa como fuente de energía extracelular. En células tales como *Chlorella protothecoides*, que como se demuestra en la presente pueden usar tanto fructosa extracelular como glucosa extracelular como fuente de energía,
10 la secreción de una invertasa puede proveer la única actividad catalítica necesaria para uso de sacarosa como una fuente de energía eficiente, no cara.

El potencial de crecimiento de microorganismos que expresan una sacarosa invertasa secretable exógena es ilustrada
15 por la adición de una invertasa al medio de cultivo de *Chlorella protothecoides*. La adición de la invertasa permite que las células sean fermentadas sobre una fuente de azúcar que contiene lignina (por ejemplo, melasa). Algas u otros organismos pueden ser diseñados como se describe en la presente
20 para crecer también sobre melasas como lo hacen sobre glucosa pura y el uso de este producto de desperdicio de bajo valor de procesamiento de caña de azúcar puede proveer ahorros de costos significativos en la producción de hidrocarburos. Las Figuras 19-20 muestran el crecimiento de células sobre tres fuentes de
25 melasas (designadas de BS1, BS2 y HTM), en comparación con el

crecimiento sobre glucosa o sacarosa en presencia o ausencia de sacarosa invertasa extracelular.

Una sacarosa invertasa puede también ser expresada intracelularmente en células que expresan un transportador de sacarosa también como en células que expresan cualquier transportador de carbohidratos que permite que la sacarosa entre a la célula.

B. Diseño de ruta de lípido

Como se describe en la presente, microorganismos útiles de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden opcionalmente ser diseñados para expresar genes particulares que pueden ser benéficos para cultivar los microorganismos (por ejemplo, la expresión de un gen de sacarosa invertasa para facilitar la utilización de una materia prima de sacarosa) o en llevar a cabo los métodos de modificación química directa de la invención (por ejemplo, expresión de un gen lítico para facilitar la disrupción de biomasa y/o expresión de un gen de lipasa para catalizar la transesterificación). Además, el diseño genético opcional puede ser usado ventajosamente para diseñar una ruta de lípido de microorganismo. Esta ruta puede ser modificada para alterar las propiedades y/o proporciones de lípidos producidos y/o incrementar el flujo de carbono a lípidos.

1. Alteración de propiedades y/o proporciones de lípidos producidos

5 En el caso de microalgas, algunas células tipo silvestre ya tienen buenas características de crecimiento pero no producen los tipos deseados o cantidades de lípidos. Ejemplos incluyen Pyrobotrys, Phormidium, Agmenellum, Cartena, Lepocinchs, Pyrobotrys, Nitzschia, Lepocinchs, Anabaena, 10 Euglena, Spirogyra, Chlorococcum, Tetraedron, Oscillatona, Phagus, and Chlorogonium, que tienen la característica de crecimiento deseable de crecer en aguas cloacales municipales o aguas de desperdicio. Tales células pueden ser diseñadas para obtener características de producción de lípidos mejoradas. Las 15 características deseadas incluyen optimizar el rendimiento de lípido por volumen unitario y/o por tiempo unitario, longitud de cadena de carbono (por ejemplo, para producción de biodiesel o para aplicaciones industriales que requieren materia prima de hidrocarburos), reducir el número de dobles o triples enlaces 20 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 lípidos distintos. Además, microalgas que producen lípidos deseables pueden también ser diseñadas para obtener rendimientos aun más 25 ventajosos. Ejemplos de tales microalgas incluyen especies del

género *Chlorella*.

En modalidades particulares, una o más enzimas clave que controlan los puntos de ramificación en el metabolismo a síntesis de ácido graso pueden ser reguladas ascendentemente o reguladas descendientemente para mejorar la producción del lípido. La regulación ascendente puede ser obtenida, por ejemplo al transformar células con constructos de expresión en los cuales un gen que codifica la enzima de interés es expresado, por ejemplo utilizando un promotor fuerte y/o elementos de mejorador que incrementan la transcripción. Tales constructos pueden incluir los marcador seleccionables de tal manera que los transformantes pueden ser sometidos a selección, lo que puede dar como resultado la amplificación del constructo y un incremento en el nivel de expresión de la enzima codificada. Ejemplos de enzimas apropiadas para regulación ascendente de acuerdo con los métodos de la invención incluyen piruvato deshidrogenasa, que juega un papel en convertir piruvato a acetil-CoA (ejemplos, algunas de microalgas, incluyen aquellos descritos bajo los números de Genbank NP_415392, AAA53047, Q1XDM1 , y CAF05587). La regulación ascendente de piruvato deshidrogenasa puede incrementar la producción de acetil-CoA y mediante esto incrementar la síntesis ácido graso. La acetil-CoA carboxilasa cataliza la etapa inicial en síntesis de ácido graso. Así, esta enzima puede ser regulada ascendentemente para incrementar la

producción de ácidos grasos (ejemplos, algunos de microalgas, incluyen aquellos descritos bajo los números de acceso de Genbank BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP_537052; YP_536879; NP_045833, y BAA57908). La producción de ácido graso puede

5 también ser incrementada mediante 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 microalga, incluyen aquellos descritos bajo los números de acceso de Genbank AOT0F8; P51280; NP_849041;

10 YP_874433). La glicerol-3-fosfato acetil transferasa cataliza la etapa limitante de 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 aquellos descritos bajo los números de acceso de

15 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

20 puede ser obtenida utilizando, por ejemplo ARN/ADN antisentido, catalítico, ARN de interferencia (ARNi), "bloqueo", "desactivación" u otras técnicas de mutagénesis. La expresión/función de enzima puede también ser inhibida utilizando intracuerpos. Ejemplos de enzimas apropiadas para

25 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.

5 Los reguladores globales modelan la expresión de los genes de la rutas biosintéticas de ácido graso. Así, uno o más reguladores globales de síntesis de ácido graso pueden ser regulados ascendentemente o regulados descendentemente, como sea apropiado, para inhibir o mejorar, respectivamente, la
10 expresión de una pluralidad de genes de síntesis de ácidos grasos y finalmente, incrementar la producción del lípido. Ejemplos incluyen proteínas de enlace de elemento regulatorio de esterol (SREBPs), tales como SREBP-1a y SREBP-1c (para ejemplo, véase Genbank aquellos descritos bajo los números de
15 acceso NP_035610 y Q9WTN3). Los reguladores globales pueden ser regulados ascendentemente o regulados descendentemente, como se describe anteriormente con respecto a la regulación de enzimas de punto de control.

 Los métodos de la invención también se pueden llevar
20 a la práctica utilizando microbios (por ejemplo, microalgas, levadura oleaginosa, bacterias u hongos) que han sido diseñadas genéticamente para expresar uno o más genes exógenos que codifican enzimas de ruta de lípido tales como por ejemplo una acil-ACP tioesterasa grasa (véanse ejemplos en la Tabla 4 con
25 números de acceso) o una proteína portadora de acilo (ACT) que

puede facilitar la escisión de ácidos grasos que tienen longitudes de cadena de carbono deseables a partir de la proteína portadora de acilo durante la síntesis del lípido. La acil-ACP tioesterasa grasa puede ser escogida en base a su especificidad para un ácido graso que tienen una longitud de cadena de carbono particular. En algunas modalidades, 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. En algunas modalidades, genes que codifican una acil-ACP tioesterasa grasa y un ACP co-expresado naturalmente pueden ser transformados a una célula, originalmente con uno o más genes que codifican otras enzimas de ruta de lípido, como se describe anteriormente. En otras modalidades, la ACP y la acil-ACP tioesterasa grasa pueden tener afinidad entre sí que imparte una ventaja cuando los dos son usados conjuntamente en los microbios y métodos de la presente invención, sin consideración de si son o no co-expresados naturalmente en un tejido u organismo particular. Así, los métodos de la presente invención se pueden llevar a la práctica con células que expresan pares co-expresados naturalmente de tales enzimas, también como con pares que comparten afinidad para interactuar entre sí para facilitar la escisión de una cadena de carbono de longitud específica de la ACP.

Ejemplos de modificaciones adicionales apropiadas

para uso en la presente invención son inscritos en la solicitud de patente estadounidense provisional ahora abandonada número 60/837,839, presentada el 15 de Agosto de 2006 y solicitud de patente estadounidense número 11/893,364, presentada el 15 de

5 Agosto de 2007, cada una de las cuales es incorporada a la presente por referencia. Esta solicitud regula 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

10 enzima de sacarosa invertasa. Los organismos fermentables resultantes producen lípidos a un costo de manufactura más bajo que aquel que ha sido obtenido mediante métodos de producción previamente conocidos. Esta solicitud co-pendiente también enseña que la inserción de los dos genes exógenos descritos

15 anteriormente puede ser combinada con la disrupción de biosíntesis de polisacárido por medio de mutagénesis dirigida y/o aleatoria, que dirige aun un flujo de carbono mayor a la producción del lípido. Individualmente y en combinación, la conversión trófica, diseño para alterar la producción de

20 lípidos y tratamiento con enzimas exógenas que alteran la combustión de lípido producida por un microorganismo. La alteración puede ser un cambio en la cantidad de lípidos producidos, la cantidad de una o más especies de lípidos producidos en relación con otros lípidos y/o los tipos de

25 especies de lípidos producidos en el microorganismo. Por

ejemplo, las microalgas pueden ser diseñadas para producir una cantidad y/o porcentaje más alto de TAG o TAG con proporciones más altas de moléculas de ácido graso de longitud de carbono particular.

- 5 Acil-ACP tioesterasas grasas apropiadas para uso con los microbios y métodos de la invención incluyen, sin limitación aquellas enlistadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Acil-ACP tioesterasas grasas y números de acceso de Genbank.

10

Acil-ACP tioesterasa grasa de Umbellulana (GenBank #AAC49001)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Cinnamomum camphom (GenBank #Q39473)

- 15 Acil-ACP tioesterasa grasa de Umbellulana californica (GenBank #Q41635)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Mynstica fragrans (GenBank #AAB71729)

- 20 Acil-ACP tioesterasa grasa de Myristica fragrans (GenBank #AAB71730)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Elaeis guineensis (GenBank #ABD83939)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Elaeis gumeensis (GenBank #AAD42220)

- 25 Acil-ACP tioesterasa grasa de Populus tomentosa (GenBank

- #ABC47311)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Arabidopsis thaliana (GenBank
#NP_172327)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Arabidopsis thaliana (GenBank
5 #CAA85387)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Arabidopsis thaliana (GenBank
#CAA85388)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Gossypium hirsutum (GenBank
#Q9SQI3)
- 10 Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea lanceolata (GenBank
#CAA54060)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea hookeriana (GenBank
#AAC72882)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea calophylla subsp (GenBank
15 #ABB71581)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea lanceolata thioesterase
(GenBank #CAC19933)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Elaeis guineensis (GenBank
#AAL15645)
- 20 Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea hookeriana (GenBank
#Q39513)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Gossypium hirsutum (GenBank
#AAD01982)
- Acil-ACP tioesterasa grasa de Vitis vinifera (GenBank
25 #CAN81819)

Acil-ACP tioesterasa grasa de *Garcinia mangostana* (GenBank #AAB51525)

Acil-ACP tioesterasa grasa de *Brassica juncea* (GenBank #ABI18986)

5 Acil-ACP tioesterasa grasa de *Madhuca* (GenBank #AAX51637)

Acil-ACP tioesterasa grasa de *Brassica napus* (GenBank #ABH11710)

Acil-ACP tioesterasa grasa de *Oryza sativa* (indica cultivar-group) (GenBank #RAY86877)

10 Acil-ACP tioesterasa grasa de *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (GenBank #NP_001068400)

Acil-ACP tioesterasa grasa de *Oryza sativa* (indica cultivar-group) (GenBank #EAY99617)

15 Acil-ACP tioesterasa grasa de *Cuphea hookenana* (GenBank #AAC49269)

Otras enzimas apropiadas para uso con los microbios y métodos de la invención incluyen aquellas que tiene por lo menos 70% de identidad de aminoácidos con una de las proteínas enlistadas en la Tabla 4 y que exhiben la actividad enzimática deseada correspondiente (esto es, escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilo). 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

20

25

menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99% de intensidad con una de las secuencias descritas anteriormente, todas las cuales son incorporadas en la presente por referencia.

5 Las enzimas de ruta de lípidos descritas anteriormente son útiles en la producción de varios lípidos a partir de un microbio (por ejemplo, una microalga, una levadura oleaginosa o un hongo) o población de microbios, mediante lo cual una acil-ACP tioesterasa grasa escinde un ácido graso de
10 una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis del lípido. Estas enzimas de ruta de lípido pueden tener 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
15 un ácido graso que tiene 16 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 catalizar una actividad enzimática (por ejemplo, escisión de un ácido graso de una ACP) con respecto al número de átomos de
20 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 14 a 18 átomos de carbono.

Al seleccionar la combinación deseada de genes
25 exógenos a ser expresados, se pueden confeccionar los

componentes de lípidos generados fuera del microbio. El microbio, cuando es cultivado como se describe anteriormente, sintetiza un ácido graso enlazada 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 TAG que incorpora la molécula de ácido graso.

2. Flujo de carbono incrementado a la ruta del lípido

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

Ejemplos de expresión de transgenes en *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 Plantarum 42(2) 209-216, (1999), Plant Pathol J 21(1) 13-20, (2005)). Cualquier técnica conveniente para introducir un

transgen a *Chlorella* puede ser empleada para propósitos de la presente invención.

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 (*Mortierella alpina*, *Mucor circinelloides*, and *Aspergillus ochraceus*) también se pueden encontrar en la literatura (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), and 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.

20 **IV. Métodos de transesterificación in situ**

La transesterificación in situ TAG a alquil esteres de ácido graso de acuerdo con los métodos de la presente invención puede ser efectuada en biomasa generada de los cultivos microbianos descritos anteriormente. En algunas

25 modalidades, la biomasa puede comprender biomasa combinada de

dos o más cultivos de cepas o especies distintas de microorganismos. En algunas modalidades, las cepas o especies distintas tienen diferentes perfiles de glicerolípidos, como se ilustra en los ejemplos 22 y 24.

5 En algunos métodos de la invención, la biomasa microbacteriana es primero cosechada del medio de cultivo y secada y luego sometida a un proceso de disrupción de biomasa opcional antes de la transesterificación. En otros métodos de la invención, la biomasa microbiana es sometida a un proceso de
10 disrupción de biomasa antes de secado y transesterificación. En algunos métodos, la cosecha de la biomasa comprende separar los componentes celulares de la biomasa del agua y medio de cultivo celular por ejemplo al hacer pasar el contenido del bioreactor de cultivo celular a través de un tamiz u aparato de filtración
15 similar. En algunas modalidades, la cosecha de la biomasa comprende el procesamiento de los componentes celulares del cultivo celular a una pasta o composición de bajo contenido de humedad.

20 **A. Métodos de secado**

 El secado de la biomasa generada de los microorganismos cultivados descritos en la presente remueve el agua que de otra manera estaría disponible como sustrato durante la reacción de transesterificación, descrita en mayor
25 detalle posteriormente en la presente, conduciendo a la

formación de ácidos grasos libres, en lugar de los alquil
esteres de ácido graso deseados. La extensión a la cual la
biomasa usada en los métodos de transesterificación in situ de
la presente invención debe ser secada depende de la proporción
5 de alcohol: biomasa usada en el proceso de transesterificación,
el costo del alcohol y el costo u otras restricciones de
volumen colocadas en el tamaño del recipiente de reacción en el
cual la transesterificación va a ser efectuada. Como se
apreciará, estos factores, equilibrados contra los costos de
10 secado de la biomasa determinan una "sequedad aceptable" para
la biomasa.

En algunas modalidades, la biomasa puede ser secada
utilizando una secadora de tambor en la cual la biomasa se hace
girar en un tambor y es secada con la aplicación de aire, que
15 puede ser calentado para acelerar el proceso de secado. En
otras modalidades, un secador de horno o secador de atomización
puede ser usado para facilitar el secado de la biomasa.
Alternativamente, la biomasa puede ser secada vía un proceso de
liofilización. El proceso de liofilización puede en resumen ser
20 descrito como un proceso de "congelación-secado", en el cual la
biomasa es congelada en una cámara de secado por congelación.
La aplicación de vacío a la cámara de secado por congelación da
como resultado la sublimación (secado primario) y desorción
(secado secundario) del agua de la biomasa, dando como
25 resultado un producto apropiado para procesamiento adicional

como se describe posteriormente en la presente. En todavía otras modalidades, una combinación de lo anterior puede ser utilizado para secar apropiadamente la biomasa para procesamiento adicional de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

B. Métodos de disrupción de biomasa

En algunas modalidades, puede ser deseable someter a disrupción la biomasa antes de la transesterificación in situ para hacer el contenido intracelular de los microorganismos más fácilmente accesibles al alcohol y reactivos de transesterificación catalíticos. Esto puede ayudar a facilitar la conversión de TAG a alquil ésteres de ácido graso u otras moléculas de acuerdo con los métodos de la invención.

En algunos métodos de la invención, la disrupción de la biomasa se puede llevar a cabo antes de someter a la biomasa a uno o más de los procesos de secado descritos anteriormente. En otros métodos, la disrupción de la biomasa puede seguir a tal proceso de secado. En algunos métodos, el agua es removida de la biomasa antes de o después de la disrupción de la biomasa, con o sin someter la biomasa a un proceso de secado. En seguida del cultivo, los microorganismos son opcionalmente aislados mediante centrifugación del medio de cultivo para generar una biomasa microbiana concentrada. La disrupción de la biomasa se puede llevar a cabo al someter a lisis las células

microbianas para producir un lisado. La lisis celular puede ser obtenida mediante cualesquier medios convenientes en los que se incluyen lisis inducida térmicamente, adición de una base, adición de un ácido, vía el uso de enzimas tales como proteasas
5 o enzimas de degradación de polisacáridos tales como amilasas, vía el uso de ultrasonido, lisis mecánica, vía el uso de 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 con el microorganismo.
10 Cada uno de esos métodos para someter a lisis un microorganismo pueden ser usados como un solo método o en combinación.

La extensión de disrupción celular puede ser observada mediante análisis microscópico. Utilizando uno o más de los métodos descritos en la presente, comúnmente más del 70%
15 de ruptura celular es observada. 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
20 incrementar la exposición del lípido celular a un catalizador para transesterificación tal como una lipasa o un catalizador químico, expresado como se describe posteriormente en la presente. La sincronización o temporización de expresión de lipasa (por ejemplo, vía un promotor inducible), lisis celular
25 y el ajuste de las condiciones de reacción de

transesterificación (por ejemplo, remoción de agua, adición de alcohol, etc.) puede ser ajustada para optimizar el rendimiento de esteres de ácido graso a partir de la transesterificación moderada por lipasa.

5 En una modalidad de la presente invención, el proceso de someter a lisis un microorganismo comprende calentar una suspensión celular que contiene los microorganismos. En esta modalidad, el medio de cultivo que contiene los microorganismos (o una suspensión de microorganismos aislados del medio de
10 cultivo) es calentado hasta que los microorganismos, esto es, las paredes y membranas celulares de microorganismos, se degradan o rompen. Comúnmente, las temperaturas aplicadas son de por lo menos 50°C. Temperaturas más altas tales como por lo menos 60°C, por lo menos 70°C, por lo menos 80°C, por lo menos
15 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.

 En otra modalidad de la presente invención, el proceso de someter a lisis un microorganismo comprende agregar
20 una base a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La base debe ser suficientemente fuerte para hidrolizar por lo menos una porción de los compuestos proteínáceos de los microorganismos usados. Bases que son útiles para solubilizar proteínas son conocidas en el arte de
25 química. Bases ejemplares que son útiles en estos métodos

incluyen pero no están limitadas a hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de litio, sodio, potasio, calcio y mezclas de los mismos. Una base preferida es KOH. En otra modalidad de la presente invención, el proceso de someter a lisis un
5 microorganismo comprende agregar un ácido a una suspensión celular que contiene el microorganismo.

En otra modalidad de la presente invención, el proceso de someter a lisis un microorganismo comprende someter a lisis el microorganismo con una enzima. Enzimas para someter
10 a lisis un microorganismo incluyen proteasas y enzimas que degradan polisacáridos tales como hemicelulosa, pectinasa, celulasa y driselasa. Una enzima que degrada polisacáridos, opcionalmente de Chlorella o un virus de Chlorella, es preferida. Un par preferido de enzimas para someter a lisis
15 biomasa portadora de aceite son alcalasa y manaway (Novozymes).

En otra modalidad de la presente invención, el proceso de someter a lisis un microorganismo es efectuado utilizando ultrasonido, esto es sonificación. Las células
20 pueden también ser sometidas a lisis con sonido de alta frecuencia. El sonido puede ser producido electrónicamente y transportado por medio de una punta metálica a una suspensión celular apropiadamente concentrada. Esta sonificación (o ultrasonificación) disrumpe la integridad celular en base a la
25 creación de cavidades en la suspensión celular.

En otra modalidad de la presente invención, el proceso de someter a lisis un microorganismo es efectuado por medios mecánicos. Las células pueden ser sometidas a lisis mecánicamente y opcionalmente homogeneizadas para facilitar la transesterificación del lípido. Por ejemplo, un disruptor a presión puede ser usado para bombear una suspensión que contiene células a través de una válvula de orificio restringido. Se aplica alta presión (de hasta 1500 bar), seguida por una expansión instantánea a través de una boquilla de salida. La disrupción celular se lleva a cabo por tres mecanismos diferentes: choques sobre la válvula, alto esfuerzo cortante de líquido en el orificio y caída de presión repentina después de 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, la células son agitadas en suspensión con partículas abrasivas pequeñas, tales como perlas. Las células irrumpen debido a las fuerzas cortantes, molienda entre perlas y colisiones con perlas. Las perlas disrumpen las células para liberar contenido celular. Las células pueden también ser sometidas a disrupción por fuerzas cortantes, tal como con el uso de mezcla (con una mezcladora de alta velocidad o mezcladora Waring), la prensa francesa o aun centrifugación en el caso de paredes celulares débiles.

En otra modalidad de la presente invención, el

proceso de someter a lisis un microorganismo es efectuado al aplicar un choque osmótico.

En otra modalidad de la presente invención, el proceso de someter a lisis un microorganismo es efectuado mediante tratamiento con vapor, esto es, por medio de adición de vapor presurizado. El tratamiento con vapor de microalgas para disrupción celular es descrito por ejemplo en la patente estadounidense No. 6,750,048.

En otra modalidad de la presente invención, el proceso de someter a lisis un microorganismo comprende infección del microorganismo con un virus lítico. Una amplia variedad de virus son conocidos para someter a lisis a microorganismos apropiados para uso en los métodos de la presente invención y la selección y uso de un virus lítico particular para un microorganismo particular esta dentro del nivel de habilidad en el arte. Por ejemplo, el virus de *Paramecium hursana chlorella* (PBCV-I) es el prototipo de un grupo (familia Phycodnaviridae, género Chlorovirus) de virus de ADN de doble hebra formadores de placa, icosaédricos, grandes que se replican en y experimentan lisis, de ciertas algas verdes semejantes a *Chlorella* eucarióticas unicelulares. Así, cualquier microalga susceptible, tal como *C. protothecoides*, 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;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.

5 En otra modalidad de la presente invención, el proceso de someter a lisis un microorganismo comprende autolisis. En esta modalidad, un microorganismo útil en los métodos de la invención es diseñado genéticamente para producir un gen lítico que someterá a lisis el microorganismo. Este gen
10 lítico puede ser expresado utilizando un promotor inducible, de tal manera que las células pueden primero ser cultivadas a una densidad deseable en un medio de cultivo y luego cosechadas, seguido por la inducción del promotor para expresar el gen lítico para someter a lisis las células. En una modalidad, el
15 gen lítico codifica una enzima que degrada 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 *Chlorella* tal como *C. protothecoides*.

20 La expresión de genes líticos se hace preferiblemente utilizando un promotor inducible, tal como un promotor activo en microalgas que es inducido por un estímulo tal como la presencia de una molécula pequeña, luz, calor y otros estímulos. Genes líticos de virus de *Chlorella* son conocidos.
25 Por ejemplo, véase Virology 260, 308-315 (1999); FEMS

Microbiology Letters 180 (1999) 45-53; Virology 263, 376-387 (1999); and Virology 230, 361-368 (1997).

En modalidades particulares, los microorganismos son sometidos a lisis después del cultivo, por ejemplo para incrementar la exposición de lípido celular a un catalizador para la transesterificación tal como una lipasa, discutida posteriormente en la presente o un catalizador químico. La sincronización de la expresión de lipasa (por ejemplo, vía un promotor inducible), lisis celular y la modificación de condiciones de reacción de transesterificación (por ejemplo, remoción de agua, adición de alcohol, etc.) puede ser ajustada para optimizar el rendimiento de esteres de ácido graso de la transesterificación moderada por lipasa.

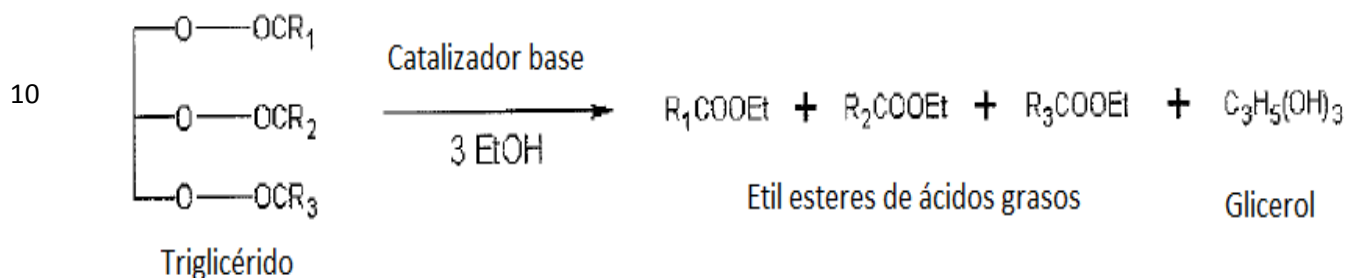
15 **C. Transesterificación**

Los lípidos producidos por microorganismos como se describe anteriormente son sometidos a un proceso de transesterificación de acuerdo con los métodos de la invención para generar una fase lipofílica que contiene alquil esteres de ácido graso y una fase hidrofílica que comprende material celular y glicerol. En algunos métodos de la invención, la fase lipofílica es luego separada del material celular hidrofílico.

1. Proceso químico general

25 Aceites de animales y plantas están compuestos

comúnmente de triacilgliceroles (TAG), que son esteres de ácidos grasos libres con el alcohol trihídrico, glicerol. En la transesterificación, el glicerol en un TAG es reemplazado con un alquil alcohol inferior tal como metanol, etanol o isopropanol. Un esquema de reacción representativo es como sigue:



15

En este esquema, 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. Se puede usar calor, también como un ácido o base para ayudar a acelerar la reacción. El ácido o base no es consumido por la reacción de transesterificación; así, no son reactivos sino catalizadores. Casi todo el biodiesel ha sido producido tradicionalmente utilizando la técnica catalizada por base, ya que requiere solamente bajas temperaturas y presiones y produce

más de 98% de rendimiento de conversión (a condición de que el aceite de partida sea bajo de humedad y ácidos grasos libres).

Un caso especial de transesterificación es glicerólisis o el uso de glicerol (glicerina) para romper
5 enlaces químicos. La reacción de glicerólisis es usualmente catalizada por la adición de un ácido o una base. La glicerólisis puede ser efectuada sobre esteres simples, grasas, ácidos grasos libres o TAG, en donde los metil esteres reaccionan con glicerol en exceso para formar mono- y/o di-
10 glicéridos, produciendo metanol como producto secundario. Los mono- y di-glicéridos son útiles como emulsificantes y son agregados comúnmente a productos alimenticios.

2. Uso de lipasas recombinantes para transesterificación

15 La transesterificación también se ha llevado a cabo experimentalmente utilizando una enzima tal como una lipasa, en lugar de una base. La transesterificación catalizada por lipasa se puede llevar a cabo, por ejemplo a una temperatura de entre la temperatura ambiente y 80°C y una proporción molar del TAG
20 al alcohol inferior mayor de 1:1, preferiblemente alrededor de 3:1. Lipasas apropiadas para uso en la transesterificación de acuerdo con los métodos de la presente invención incluyen pero no están limitadas a aquellas enlistadas en la Tabla 5. Otros ejemplos de lipasas útiles para transesterificación son
25 encontradas en, por ejemplo patentes estadounidenses 4,798,793;

4,940,845 5,156,963; 5,342,768; 5,776,741 y WO89/01032, cada una de las cuales es incorporada a la presente por referencia.

Tabla 5. Lipasas para uso en transesterificación

- 5 Lipasa *Aspergillus niger* ABG73614, lipasa B de *Candida antarchca* (novozym-435) CAA83122, lipasa de *Candida cyhndracea* AAR24090, 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*
- 10 *miehei* (Lipozyme IM 20), lipasa de *Pseudomonas fluorescein* AAA25882, lipasa de *Rhizopus japonicas* (Lilipase A-IOFG) Q7M4U7_1, lipasa de *Rhizomucor miehei* B34959, lipasa de *Rhizopus oryzae* lipase (Lipasa F) AAF32408, lipasa de *Serratia marcescens* (SM Enzyme) ABI13521, lipasa de *Thermomyces*
- 15 *lanuginosa* CAB58509, Lipasa P (Nagase Chemtex Corporation) y Lipase QLM (Meito Sangyo Co , Ltd , Nagoya, Japan).

Un reto al uso de lipasas 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

20 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 número mínimo de ciclos para permitir que un proceso a base de

25 lipasa compita con el proceso de base fuerte en términos del

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 (expedida el 4 de junio de 2002 a Wu et al.),
5 incorporada en la presente por referencia, describe métodos para mejorar 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 el
10 lípido con el cual la lipasa actúa. Lipasas recombinantes apropiadas incluyen aquellas enlistadas anteriormente en la Tabla 5 y/o aquellas descritas bajo los Números de Acceso de GenBank enlistados anteriormente en la Tabla 5 o un polipéptido que tiene por lo menos 70% de identidad de aminoácido con una
15 de las lipasas enlistadas anteriormente en la Tabla 5 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
20 aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% de identidad con una de las secuencias descritas anteriormente, todas las cuales son incorporadas en la presente por referencia.

Un diseño de vector ejemplar para expresión de un gen
25 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 lipasa, el gen de lipasa puede ser transformado a las células

5 de tal manera que se mueve enlazado operativamente a un promotor endógeno en el punto de integración del vector. El método de transformación sin promotor ha sido demostrado en microalgas (véase por ejemplo, *Plant Journal* 14: 4, (1998), pp. 441-447). El vector puede también contener un segundo gen que

10 codifica una proteína que 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. Casetes de expresión que codifican los dos genes pueden ser enlazados

15 físicamente en el vector o sobre vectores separados. La cotransformación de microalgas puede también ser usada, en la cual moléculas de vector distintas son usadas simultáneamente para transformar células (véase por ejemplo, *Protist* diciembre de 2004; 155(4): 381-93). Las células transformadas pueden

20 opcionalmente ser seleccionadas en base a la habilidad de crecer en presencia del antibiótico u otro marcador seleccionable bajo condiciones en las cuales las células que carecen del casete de resistencia no crecerían.

El ADN que codifica la lipasa y marcador

25 seleccionable puede ser cADN codón-optimizado. Métodos de

recodificación de genes para expresión en microalgas son descritos en la patente estadounidense No. 7,135,290. Información adicional está disponible en la dirección web www.kasuga.or.jp/codon.

5 Muchos promotores son activos en microalgas, incluyendo 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
10 de plantas o virus de algas). Los promotores exógenos y/o endógenos que son activos en microalgas y genes de resistencia antibiótico funcionales en microalgas son conocidos en el arte. El promotor usado para expresar un gen exógeno puede ser el promotor enlazado naturalmente al gen o pueden ser un gen
15 heterólogo. Algunos promotores son activos en más de una especie de microalgas. Otros promotores son específicos de especies. Promotores preferidos incluyen promotores tales como RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtii* y promotores virales, tales como virus del mosaico de coliflor (CMV) y virus de *Chlorella*,
20 que han mostrado ser activos en múltiples especies de microalgas (véase por ejemplo, *Plant Cell Repr.* Marzo de 2005, 23(10-11): 727-35; *J. Microbiol.* Agosto de 2005; 43(4): 361-5; *Mar Biotechnol.* (NY). Enero de 2002; 4(1): 63-73).

 Promotores, cADN y 3'UTR, también como otros
25 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. (3^a edición, 2001, Cold Spring Harbor Press y patente estadounidense No. 4,683,202).

5 Alternativamente, los elementos pueden ser generados sintéticamente utilizando métodos conocidos (véase por ejemplo, *Gene*, 16 de octubre de 1995; 164(1): 49-53).

Las células pueden ser transformadas mediante cualquier técnica apropiada en las que se incluyen, por
10 ejemplo, biholística, electroporación, transformación de perla de vidrio y transformación de vibrisas de carburo de silicio.

En modalidades particulares, la lipasa es expresada de manera invisible y/o apuntada. El uso de un promotor inducible para expresar un gen de lipasa permite la producción
15 de la lipasa después del cultivo 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
20 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, temperatura (frío o calor), luz, etc. Promotores
25 apropiados pueden activar la transcripción de un gen

esencialmente silente o regular ascendentemente, de preferencia sustancialmente, la transcripción de un gen enlazado operativamente que es transcrito a bajo nivel. En el último caso, el nivel de transcripción de la lipasa de preferencia no
5 interfiere significativamente con el crecimiento del microorganismo en el cual es expresada.

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
10 celulares hasta el inicio de la reacción de transesterificación.

3. Ventajas de biomasa con una proporción de aceite: aceite más alta

15 La transesterificación directa de productos agrícolas se ha efectuado como se reporta en las publicaciones de solicitudes de patentes estadounidenses Nos. 20030229237 (publicada el 11 de diciembre de 2003) y 20050020842 (publicada el 27 de enero de 2005). Estos procesos emplean materiales
20 tales como soja, coco, palma, maíz, algodón, lino, colsa/canola, cártamo, girasol u otras materias primas de aceite o grasas animales como el sustrato para un proceso de transesterificación produzca alquilésteres de ácido graso.

Una ventaja particular de usar microorganismos, como
25 se describe en la presente, para la generación de TAG útiles en

los métodos de transesterificación de la presente invención, es la habilidad para modular la proporción de aceite a sin aceite en la biomasa, que se ha encontrado inesperadamente imparte dos características ventajosas. En primer lugar, como se muestra en

5 los ejemplos a continuación, la transesterificación de biomasa que tiene una proporción de aceite:sin aceite más alta conduce a una eficiencia incrementada en la conversión de TAG a alquilésteres de ácido graso. En segundo lugar, como también se muestra en los ejemplos a continuación, la transesterificación

10 de biomasa que tiene una proporción de aceite:sin aceite más alta produce un producto de biodiesel con proporciones reducidas de heteroátomos indeseables. En el último caso, la fase lipofílica generada por la transesterificación comprende fósforo en una cantidad en peso no mayor de 60 partes por

15 millón. En algunas modalidades, la cantidad de fósforo en peso en la fase lipofílica no es mayor de 25 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad de fósforo en peso en la fase lipofílica no es mayor de 10 partes por millón. En otras modalidades, la cantidad de azufre en peso en la fase

20 lipofílica no es mayor que 80 partes por millón y en todavía otras modalidades, la cantidad de azufre en peso en la fase lipofílica no es mayor de 60 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad de azufre en peso en la fase lipofílica no es mayor de 15 partes por millón. En algunas

25 modalidades, la cantidad de hierro en peso en la fase

lipofílica no es mayor de 2 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad de cinc en peso en la fase lipofílica no es mayor de 40 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad de cinc en peso en la fase lipofílica no es mayor de 12 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad combinada de magnesio y calcio en peso en la fase lipofílica no es mayor de 5 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad combinada de sodio y potasio en peso en la fase lipofílica no es mayor de 50 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad combinada de sodio y potasio en peso de la fase lipofílica no es mayor de 15 partes por millón. Algunos métodos de la invención producen un producto en el cual dos o más de los siguientes heteroátomos o combinaciones de heteroátomos están limitados en concentración en la fase lipofílica del material transesterificado a las siguientes concentraciones: azufre es menos de 15 partes por millón; fósforo es menos de 20.001% de masa total; la cantidad combinada de magnesio y calcio no es mayor de 5 partes por millón y la cantidad combinada de sodio y potasio no es mayor de 15 partes por millón.

Otro aspecto de la biomasa de alto contenido de aceite cultivada heterotróficamente en particular microalgas, es la cantidad de carotenoides resultantes en la fase lipofílica después de la transesterificación. En algunas modalidades de la presente invención, la cantidad de proteína

no es mayor de 400 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de luteína no es mayor de 200 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de luteína no es mayor de 100 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de luteína no es mayor de 40 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de luteína no es menor de 5 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de luteína no es menor de 10 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de luteína no es menor de 30 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la fase lipofílica contiene una cantidad de luteína entre cualquier combinación de los niveles máximos y mínimos indicados anteriormente, tal como menor de 400 y por lo menos 5 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de luteína es aproximadamente 35 microgramos por gramo de fase lipofílica.

En algunas modalidades, la cantidad de zeaxantina no es mayor de 275 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de zeaxantina no es mayor de 150 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de zeaxantina no es mayor de 75 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas

modalidades, la cantidad de zeaxantina no es mayor de 25 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de zeaxantina no es mayor de 0.5 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de zeaxantina no es menor de 10 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de zeaxantina no es menor de 20 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la fase lipofílica contiene una cantidad de zeaxantina entre cualquier combinación de los niveles máximo y mínimos citados anteriormente, tal como menor de 275 y por lo menos 0.5 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de zeaxantina es de aproximadamente de 23 microgramos por fase lipofílica.

En algunas modalidades, la cantidad de α -criptoxantina no es mayor de 8 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -criptoxantina no es mayor de 5 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -criptoxantina no es mayor de 2 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -criptoxantina no es mayor de 0.1 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -criptoxantina no es menor de 0.001 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -

criptoxantina no es menor de 0.01 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -criptoxantina no es menor de 0.05 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la fase lipofílica tiene
5 una cantidad de α -criptoxantina entre cualquier combinación de los niveles máximo y mínimo citados anteriormente, tal como menor de 8 y por lo menos 0.01 microgramos por gramos de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -criptoxantina es de aproximadamente 0.06 microgramos por gramos
10 de fase lipofílica.

En algunas modalidades, la cantidad de β -criptoxantina no es mayor de 18 microgramos por gramos de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -criptoxantina no es mayor de 8 microgramos por gramos de fase
15 lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -criptoxantina no es mayor de 4 microgramos por gramos de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -criptoxantina no es mayor de 2 microgramos por gramos de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -criptoxantina no es menor de 0.1 microgramos por gramos de fase
20 lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -criptoxantina no es menor de 1 microgramo por gramos de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -criptoxantina no es menor de 1.5 microgramos por gramos de fase
25 lipofílica. En algunas modalidades, la fase lipofílica contiene

una cantidad de β -criptoxantina entre cualquier combinación de los niveles máximo y mínimo citados anteriormente, tal como menor de 18 y por lo menos 0.1 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -criptoxantina es aproximadamente 1.8 microgramos por gramo de fase lipofílica.

En algunas modalidades, la cantidad de α -caroteno no es mayor de 1.9 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -caroteno no es mayor de 1 microgramo por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -caroteno no es mayor de 0.1 microgramo por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -caroteno no es mayor de 0.09 microgramo por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -caroteno no es menor de 0.0005 microgramo por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -caroteno no es menor de 0.01 microgramo por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -caroteno no es menor de 0.05 microgramo por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la fase lipofílica contiene una cantidad de α -caroteno ente cualquier combinación de los niveles máximo y mínimo citados anteriormente, tal como menor de 1.9 y por lo menos 0.0005 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de α -caroteno es de

aproximadamente 0.08 microgramos por gramo de fase lipofílica.

En algunas modalidades, la cantidad de β -caroteno no es mayor de 14 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -caroteno no es mayor de 5 10 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -caroteno no es mayor de 4 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -caroteno no es mayor de 1.5 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas 10 modalidades, la cantidad de β -caroteno no es mayor de 0.1 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -caroteno no es menor de 0.1 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β -caroteno no es menor de 1 15 microgramo por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la fase lipofílica contiene una cantidad de β -caroteno entre cualquier combinación de los niveles máximos y mínimos citados anteriormente, tal como menor de 14 y por lo menos 0.1 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas 20 modalidades, la cantidad de β -caroteno es aproximadamente 0.1 microgramos por gramo de fase lipofílica.

La eficiencia incrementada con la cual los TAG son convertidos a alquilésteres de ácido graso y la proporción reducida de heteroátomos introducidos a la fase lipofílica, vía 25 aplicación de los métodos de la presente invención a biomasa

que comprende una alta proporción de aceite:sin aceite son ventajas inesperadas. Ejemplos que muestran la eficiencia mejorada con la cual el aceite puede ser transesterificado y la proporción reducida de heteroátomos en el producto transesterificado, son descritos posteriormente en la presente.

En algunas modalidades, la proporción de aceite:sin aceite de la biomasa seca sometida a transesterificación u otros métodos de modificación química es de por lo menos 1:20, por lo menos 1:19, por lo menos 1:18, por lo menos 1:17, por lo menos 1:16, por lo menos 1:15, por lo menos 1:14, por lo menos 1:13, por lo menos 1:12, por lo menos 1:11, por lo menos 1:10, por lo menos 1:9, por lo menos 1:8, por lo menos 1:7, por lo menos 1:6, por lo menos 1:5, por lo menos 1:4, por lo menos 1:3, por lo menos 1:2 o por lo menos 1:1. En otras modalidades, la proporción de aceite:sin aceite de la biomasa seca sometida a transesterificación es por lo menos 1.1:1, por lo menos 1.2:1, por lo menos 1.3:1, por lo menos 1.4:1, por lo menos 1.5:1, por lo menos 1.6:1, por lo menos 1.7:1, por lo menos 1.8:1, por lo menos 1.9:1, por lo menos 2:1, por lo menos 3:1, por lo menos 4:1, por lo menos 5:1, por lo menos 6:1, por lo menos 7:1, por lo menos 8:1, por lo menos 9:1 o por lo menos 10:1.

V. OTROS MÉTODOS DE MODIFICACIÓN QUÍMICA DE BIOMASA QUE CONTIENE LÍPIDOS

La presente invención provee métodos de modificación química diferente a la transesterificación que produce un producto útiles en una variedad de aplicaciones industriales y otras aplicaciones, en las que se incluyen hidrogenación, 5 interesterificación, hidroxilación e hidrólisis más derivación. De manera similar a aquella descrita anteriormente con referencia a la transesterificación, éstas modificaciones químicas pueden también ser efectuadas sobre biomasa generada de los cultivos microbianas descritos en la presente. En 10 algunas modalidades, la biomasa puede comprender biomasa combinada de dos o más cultivos de cepas o especies distintas de microorganismos. En algunas modalidades, las distintas cepas o especies tienen diferentes perfiles de glicerol líquido, como se ilustra en el Ejemplo 22. En algunos métodos de la 15 invención, la biomasa microbiana es primero cosechada del medio de cultivo y luego sometida a una reacción química que modifica covalentemente por lo menos 1% del lípido. En algunas modalidades, por lo menos 2%, por lo menos 3%, por lo menos 4%, por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo 20 menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% del lípido es modificado por el proceso químico.

A. Hidrogenación: Saturación de dobles enlaces

25 La hidrogenación es la adición de hidrógeno a dobles

enlaces en los constituyentes de ácido graso de glicerolípidos o de ácidos grasos libres. El proceso de hidrogenación permite la transformación de aceites líquidos a grasas semisólidas o sólidas, que pueden ser más apropiadas para aplicaciones
5 específicas. La hidrogenación es un proceso químico bien conocido y en general comprende poner en contacto una mezcla de aceite con un catalizador de metal de transición finamente dividido (por ejemplo, níquel, paladio, platino o rodio) a una temperatura elevada (por ejemplo, 140-225° C) en presencia de
10 hidrógeno.

La hidrogenación de biomasa producida por los métodos descritos en la presente puede ser efectuado en conjunción con uno o más de los métodos y/o materiales provistos en la presente, en los que se incluyen biomasa microbiana con un
15 porcentaje de DCW como lípido de por lo menos 20% o para producir productos, como se reporta en los siguientes: patentes estadounidenses Nos. 7,288,278 (aditivos de alimentos o medicamentos); 5,346,724 (productos de lubricación); 5,475,160 (alcoholes grasos); 5,091,116 (aceites comestibles); 6,808,737
20 (grasas estructurales para margarina y dispersiones); 5,298,637 (sustitutos de grasa de bajas calorías); 4,581,139 (catalizador de hidrogenación y adsorbentes de azufre); 5,233,099 y 5,233,100 (alcoholes grasos); 4,584,139 (catalizadores de hidrogenación); 6,057,375 (agentes de supresión de espumado) y
25 7,118,773 (dispersiones de emulsión comestible), cada una de

las cuales es incorporada en la presente por referencia.

B. Interesterificación: Intercambio de componentes de ácido graso de glicerolípidos

5 Los glicerolípidos producidos de manera natural comúnmente no tienen una distribución uniforme de constituyentes de ácido graso. En el contexto de aceites, la interesterificación se refiere al intercambio de radicales acilo entre dos ésteres de diferentes glicerolípidos. El

10 proceso de interesterificación provee un mecanismo mediante el cual los constituyentes de ácido graso de una mezcla de glicerolípidos puede ser rearrreglado para modificar el patrón de distribución. La interesterificación es un proceso químico bien conocido y comprende en general el calentamiento de una

15 mezcla (a una temperatura de aproximadamente 200° C) de aceites por un período (por ejemplo, 30 minutos) en presencia de un catalizador, tal como un metal alcalino o alquilato de metal alcalino (por ejemplo, metóxido de sodio). Este proceso puede ser usado para aleatorizar el patrón de distribución de los

20 constituyentes de ácido graso de una mezcla de aceite o puede ser dirigido para producir un patrón de distribución deseado. Este método de modificación química de lípidos puede ser efectuado sobre materiales provistos en la presente, tal como una masa microbiana con un porcentaje de lípido de DCW de por

25 lo menos 20%.

Durante la interesterificación, en la cual se busca un patrón de distribución específico de ácidos grasos, puede ser efectuado al mantener la mezcla de aceite a una temperatura menor que el punto de fusión de algunos TAG que podrían estar
5 presentes. Esto da como resultado la cristalización selectiva de estos TAG, que los elimina efectivamente de la reacción a medida que cristalizan. El proceso puede ser proseguido hasta que la mayoría de los ácidos grasos en el agente han precipitado. Un proceso de interesterificación dirigido puede
10 ser usado para producir por ejemplo, un producto con un contenido de calorías más bajo vía la sustitución de ácidos grasos de cadena más larga con contraparte de cadena más corta. La interesterificación dirigida puede también ser usada para producir un producto con una mezcla de grasas que puede proveer
15 características de fusión deseadas y elementos estructurales buscados en aditivos de alimentos o productos alimenticios (por ejemplo, margarina) sin recurrir a la hidrogenación, que puede producir isómeros trans indeseables.

La interesterificación de biomasa producida por los
20 métodos descritos en la presente puede ser efectuada en conjunción con uno o más de los métodos y/o materiales o para producir productos, como se reporta en los siguientes: patentes estadounidenses Nos. 6,080,853 (sustitutos de grasa no digeribles); 4,288,378 (estabilizador de manteca de cacahuete);
25 5,391,383 (aceite de atomización comestible); 6,022,577 (grasas

comestibles para productos alimenticios); 5,434,278 (grasas comestibles para productos alimenticios); 5,268,192 (productos de nuez de bajo contenido de calorías); 5,528,197 (composiciones comestibles de calorías reducidas); 4,335,156 (producto de
5 grasa comestible); 7,288,278 (aditivos de alimentos o medicamentos); 7,115,760 (proceso de fraccionamiento); 6,808,737 (grasas estructurales); 5,888,947 (lubricantes de motor); 5,686,131 (mezclas de aceite comestible) y 4,603,188 (composiciones de uretano curables), cada una de las cuales es
10 incorporada en la presente por referencia.

En una modalidad de la invención, la transesterificación de la biomasa, como se describe en la presente, es seguida por reacción del producto transesterificado con poliol, como se reporta en la patente
15 estadounidense No. 6,465,642, incorporada en la presente por referencia, para producir poliésteres de ácido graso de poliol. La transesterificación puede también ser efectuada sobre biomasa microbiana con ésteres de ácido graso de cadena corta, como se reporta en la patente estadounidense No. 6,278,006,
20 incorporada en la presente por referencia.

C. Hidroxilación: Saturación vía la adición de agua a dobles enlaces

La hidroxilación involucra la adición de agua a un
25 doble enlace dando como resultado saturación y la incorporación

de una porción hidroxilo. El proceso de hidroxilación provee un mecanismo para convertir uno o más constituyentes de ácido graso de un glicerolípido a un hidroxiácido graso. La hidroxilación puede ser efectuada, por ejemplo, vía el método reportado en la patente estadounidense No. 5,576,027, incorporada en la presente por referencia. Los ácidos grasos hidroxilados, en los que se incluyen aceite de ricino y sus derivados, son útiles como componentes en varias aplicaciones industriales, en las que se incluyen como aditivos de alimentos, surfactantes, agentes de humectación de pigmentos, agentes desespumantes, aditivos a prueba de agua, agentes plastificantes, agentes de emulsificación de cosméticos y/o desodorantes, también como en electrónicos, agentes farmacéuticos, pinturas, tintas, adhesivos y lubricantes.

La hidroxilación de biomasa microbiana producida por los métodos descritos en la presente puede ser efectuada en conjunción con uno o más de los métodos y/o materiales o para producir productos, como se reporta en los siguientes: patentes estadounidenses Nos. 6,590,113 (recubrimientos a base de aceite y tinta); 4,049,724 (proceso de hidroxilación); 6,113,971 (manteca de aceite de oliva); 4,992,189 (lubricantes y aditivos lubricantes); 5,576,027 (leche hidroxilada) y 6,869,597 (cosméticos), cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia.

Los glicerolípidos hidroxilados pueden ser

convertidos a estolatos. Los estolatos consisten de un glicerolípido en el cual un constituyente de ácido graso hidroxilado ha sido esterificado a otra molécula de ácido graso. La conversión de glicerolípidos hidroxilados a estolatos se puede llevar a cabo al calentar una mezcla de glicerolípido y ácidos grasos y poner en contacto la mezcla con un ácido mineral, como se describe por Isbell et al., *JAACS* 71(2): 169-174 (1994), incorporada en la presente por referencia. Los estolatos son útiles en una variedad de aplicaciones, en las que se incluyen sin limitación aquellas reportadas en los siguientes: patentes estadounidenses Nos. 7,196,124 (materiales elastoméricos y cubiertas de piso); 5,458,795 (aceites espesos para aplicaciones de alta temperatura); 5,451,332 (fluidos para aplicaciones industriales); 5,427,704 (aditivos de combustible) y 5,380,894 (lubricantes, grasas, plastificantes y tintas de impresión), cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia.

D. Hidrólisis más derivación: Escisión y modificación de ácidos grasos libres

La hidrólisis de los constituyentes de ácido graso de los glicerolípidos producidos por los métodos de la invención produce ácidos grasos libres que pueden ser derivados para producir otras entidades químicas útiles. La hidrólisis ocurre en presencia de agua y un catalizador ácido o base. Los ácidos

grasos libres pueden ser derivados para producir una variedad de productos, como se reporta en los siguientes: patentes estadounidenses Nos. 5,304,664 (ácidos grasos altamente sulfatados); 7,262,158 (composiciones de limpieza); 7,115,173
5 (composiciones reblandecedoras de telas); 6,342,208 (emulsiones para tratamiento de la piel); 7,264,886 (composiciones repelentes de agua); 6,924,333 (aditivos de pintura); 6,596,768 (materia prima de rumiantes enriquecida de lípidos) y 6,380,410 (surfactantes para detergentes y limpiadores), cada una de las
10 cuales es incorporada en la presente por referencia.

E. Reacciones químicas adicionales para modificar biomasa microbiana que contiene lípidos

Otras reacciones químicas que pueden ser efectuadas
15 sobre biomasa microbiana que contiene lípidos incluyen hacer reaccionar los triacilgliceroles con un agente de ciclopropanación para mejorar la fluidez y/o estabilidad oxidante, como se reporta en la patente estadounidense No. 6,051,539; manufactura de ceras a partir de trioacilgliceroles,
20 como se reporta en la patente estadounidense No. 6,770,104 y epoxidación de triacilgliceroles, como se reporta en "The effect of fatty acid composition on the acylation kinetics of epoxidized triacylglycerols", Journal of the American Oil Chemists Society, 79: 1, 59-63 (2001) y Free Radical Biology
25 and Medicine, 37: 1, 104-114 (2004), cada una de las cuales es

incorporada en la presente por referencia.

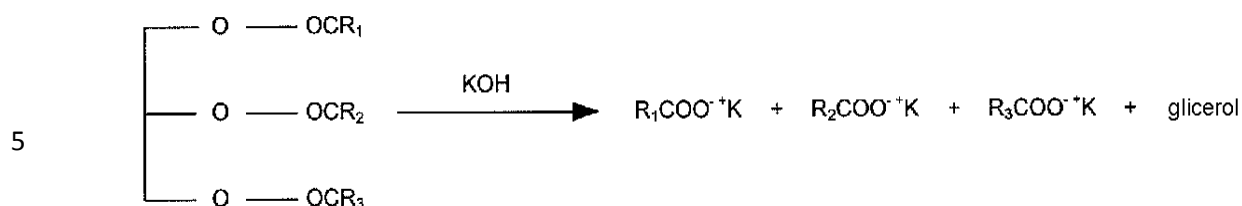
En algunos métodos, la primera etapa de modificación es hidroprocesamiento para saturar dobles enlaces, seguido por desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno y un catalizador. En algunos métodos, la hidrogenación y desoxigenación ocurren en la misma reacción. En otros métodos, la desoxigenación ocurre antes de la hidrogenación. La isomerización es luego efectuada opcionalmente, también en presencia de hidrógeno y un catalizador. Finalmente, los gases y componentes de nafta pueden ser removidos si se desea. Por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses Nos. 5,475,160 (hidrogenación de triglicéridos); 5,091,116 (desoxigenación, hidrogenación y remoción de gas); 6,391,815 (hidrogenación) y 5,888,947 (isomerización), cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia.

F. Saponificación de biomasa microbiana portadora de aceite y aceite extraído

1. Química básica de saponificación

Los aceites de animales y plantas están compuestos comúnmente de triacilgliceroles (TAG), que son ésteres de ácidos grasos con el alcohol trihídrico, glicerol. En una reacción de hidrólisis alcalina, el glicerol en un TAG es removido, dejando tres aniones de ácido carboxílico que se pueden asociar con cationes de metal alcalino tales como sodio

o potasio para producir sales de ácido graso. Un esquema de reacción es como sigue:



En este esquema, los constituyentes de ácido carboxílico son escindidos de la porción triglicerol y reemplazados con grupos hidroxilo. La cantidad de base (por ejemplo, KOH) que es usada en la reacción es determinada por el grado de saponificación deseado. Si el objetivo es por ejemplo, producir un producto de jabón que comprende algunos de los aceites originalmente presentes en la composición de TAG, una cantidad de base insuficiente para cubrir todos los TAG a sales de ácido graso es introducida a la mezcla de reacción. Normalmente, esta reacción es efectuada en una solución acuosa y procede lentamente, pero puede ser acelerada por la adición de calor. La precipitación de las sales de ácido graso puede ser facilitada mediante la adición de sales, tales como haluros de metal alcalino solubles en agua (por ejemplo, NaCl o KCl) a la mezcla de reacción. Preferiblemente, la base es un hidróxido de metal alcalino tal como NaOH o KOH. Alternativamente, otras bases, tales como alcanolaminas, en las que se incluyen por ejemplo, trietanolamina o aminometilpropanol, pueden ser usados

en el esquema de reacción. En algunas modalidades, estas alternativas pueden ser preferidas para producir el producto de jabón claro.

5 **2. Saponificación de biomasa portadora de aceite**

La saponificación de biomasa microbiana portadora de aceite puede ser efectuada de acuerdo con los métodos de la invención sobre biomasa intacta o biomasa que ha sido sometida a disrupción antes de ser sometida a la reacción de hidrólisis

10 alcalina. En el primer caso, la biomasa microbiana intacta generada vía el cultivo de microorganismos como se define en la presente puede ser puesta en contacto directamente con una base para convertir los componentes de lípidos que contienen éster de la biomasa a sales de ácido graso. En algunas modalidades,

15 toda o una porción del agua en la cual los microbios han sido cultivados es removida y la biomasa es resuspendida en una solución acuosa en una cantidad de base suficiente para saponificar la porción deseada del glicerolípido y componentes de éster de ácido graso de la biomasa. En algunas modalidades,

20 menos del 100% de los glicerolípidos y ésteres de ácido graso en la biomasa son convertidos a sales de ácido graso.

En algunos métodos de la invención, la biomasa es sometida a disrupción antes de ser sometida a la reacción de hidrólisis alcalina. La disrupción de la biomasa puede ser

25 efectuada vía cualquiera de uno o más de los métodos descritos

anteriormente para someter a lisis las células, en las que se incluyen lisis inducida por calor, lisis mecánica o los semejantes, para hacer los componentes intracelulares de los microorganismos más fácilmente accesibles a la base. Esto puede
5 ayudar a facilitar la conversión de TAG o ésteres de ácido graso a sales de ácido graso. Aunque se puede usar lisis inducida por ácido para someter a disrupción la biomasa antes de la saponificación, otros métodos pueden ser más deseables para reducir la posibilidad de que base adicional será
10 consumida para neutralizar cualquier ácido restante durante la reacción de hidrólisis alcalina, lo que puede impactar la eficiencia de conversión basal de ácido graso. Debido a que la aplicación de calor puede acelerar la reacción de hidrólisis alcalina, la lisis inducida por calor puede ser usada antes o
15 durante la reacción de saponificación para producir las sales de ácido graso.

En algunas modalidades de la invención, la biomasa no es sometida a ningún tratamiento o cualquier tratamiento diferente a disrupción, antes de ser sometida a la reacción de
20 hidrólisis alcalina. En algunas modalidades, el enriquecimiento previo de la biomasa para incrementar la proporción de lípido a material no lípido en la biomasa a más de 50% (o por más de 50%) en peso es efectuado como se describe en la presente. En otras modalidades, la biomasa es sometida a la reacción de
25 hidrólisis alcalina sin una etapa de enriquecimiento previo. En

algunas modalidades, la biomasa sometida a la reacción de hidrólisis alcalina contiene componentes diferentes a agua en las mismas proporciones relativas como la biomasa en el punto de cosecha. En aquellas modalidades en las cuales
5 sustancialmente toda el agua ha sido removida, la biomasa comprende una emulsión celular o concentrado en emulsión sustancialmente secos.

Cualquiera de los microorganismos descritos en la presente pueden ser usados para producir biomasa que contiene
10 lípidos para la producción de aceite saponificados. En algunas modalidades, los microorganismos pueden también impartir otras características de las composiciones de aceite saponificadas producidas de los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, microalgas de diferentes especies, también como
15 microalgas cultivadas bajo diferentes condiciones, varían en color, en los que se incluyen verde, amarillo, anaranjado, rojo y los semejantes. Pequeñas cantidades de los compuestos que imparten estos colores a las microalgas pueden ser retenidos a propósito de tal manera que las composiciones de aceite
20 saponificado resultante y mediante esto proveer colorantes naturales. En algunas modalidades, otros constituyentes de la biomasa, en los que se incluyen carotenoides y xantofilas, pueden también ser obtenidos en pequeñas cantidades en las composiciones de aceite saponificado.

25 La extensión de saponificación de la biomasa puede

variar en los métodos de la invención. En algunas modalidades, es deseable producir una composición de aceite saponificada que también incluye constituyentes de glicerolípido de la biomasa. La cantidad apropiada de base (por ejemplo, NaOH) para uso en la reacción de hidrólisis alcalina puede ser determinada en base a un análisis del glicerolípido y contenido de éster de ácido graso de la biomasa. En algunas modalidades, es preferible usar un exceso de base para saponificar biomasa que contiene lípidos directamente, debido a que algo de la base puede ser consumida por reacción con otros constituyentes de la biomasa. En algunas modalidades, el uso de cantidades en exceso de base para saponificar los constituyentes de lípidos que contienen éster de la biomasa da como resultado una composición de aceite saponificada que es indeseablemente alcalina. En estas instancias, la composición puede ser purificada para reducir la alcalinidad de la composición al ebullición de la composición de aceite saponificada en agua y re-precipitar las sales de ácido graso vía adición de sales tales como NaCl, KCl o los semejantes. La composición de jabón purificada puede luego ser sometida a procesamiento adicional, tal como remover agua en exceso, introducir varios aditivos a la composición de jabón, moldear el jabón en barras u otras formas y los semejantes.

En algunas modalidades, las sales de ácido graso (también denominadas como aceites saponificados) generadas de

los métodos descritos en la presente pueden ser combinadas con uno o más aditivos seleccionados de aceites esenciales, aceites de fragancia, aceites de sabor, botánicos, extractos, extractos de CO₂, arcillas, colorantes, dióxido de titanio, mica, hierbas de tinte, agentes de deslizamiento, exfoliantes, semillas de fruta, fibras, polvos de grano, harinas de nuez, harinas de semillas, perlas de ajeno, perlas de cera, hierbas, hidrosoles, vitaminas, polvos de leche, conservadores, antioxidantes, tocoferoles, sales, azúcares, aceites vegetales, ceras, glicerina, vegetales de mar, aceites nutritivos, aceites humectantes, mantequillas vegetales, propilenglicol, parabenos, miel, cera de abeja, aloe, polisorbato, almidón de maíz, polvo de cocoa, polvo de coral, humectantes, gomas, agentes emulsificantes y espesantes o cualesquier otros aditivos descritos en la presente.

3. Saponificación del aceite extraído

El grado de saponificación de los constituyentes de lípidos extraídos de la biomasa puede ser más fácilmente controlado debido a la probabilidad reducida de que la base será consumida por medio de interacción con componentes diferentes a glicerolípidos o ésteres de ácido grasos presentes en el aceite extraídos. La extracción de los constituyentes de lípidos puede ser efectuada vía procedimientos de fracción de hexano convencionales o vía un procedimiento de extracción de

aceite o procedimiento de extracción sin solvente.

La extracción de hexano convencional (otros solventes orgánicos apropiados pueden también ser usados) comprende en general poner en contacto la biomasa o lisado con hexano en una cantidad y por un período de tiempo suficiente para permitir que el lípido forme una solución con el hexano. La mezcla puede luego ser filtrada y el hexano removido por ejemplo, mediante rotoevaporación. Los métodos de extracción de hexano son bien conocidos en el arte.

La extracción de aceite incluye la adición de un aceite directamente a un lisado sin separación previa de los componentes del lisado. Después de la adición del aceite, el lisado se separa ya sea de sí mismo o como resultado de centrifugación o los semejantes en diferentes capas. Las capas pueden incluir en orden de densidad decreciente: una pelotilla de sólidos pesados, una fase acuosa, una fase de emulsión y una fase de aceite. La fase de emulsión es una emulsión de lípidos y fase acuosa. Dependiendo del porcentaje de aceite agregado con respecto al lisado (peso/peso o volumen/volumen), la fuerza de centrifugación si la hay, volumen de medio acuoso y otros factores, ya sea uno u otro o ambas de las fases de emulsión y aceite pueden estar presentes. La incubación o tratamiento del lisado celular o la fase de emulsión con el aceite es efectuada por un tiempo suficiente para permitir que el lípido producido por el microorganismo sea solubilizado en el aceite o forme una

mezcla heterogénea.

En varias modalidades, el aceite usado en el proceso de extracción se selecciona del grupo que consiste de aceite de
5 soya, colza, canola, palma, palma de almendra, coco, maíz, aceite vegetal de desecho, sebo chino, aceitunas, girasol, semilla de algodón, grasa de pollo, sebo de res, sebo porcino, microalgas, macroalgas, *Cuphea*, lino, maní, grasa blanca escogida (manteca de cerdo), mostaza de nuez de semilla de
10 marañón *Camelina sativa*, avena, lupino, kenaf, caléndula, cáñamo, café, linaza, avellana, euforbio, semilla de calabaza, cilantro, camelia, ajonjolí, cártamo, arroz, árbol de aceite de tung, cacao, copra, cachorro de pium, granos de ricino, nuez, jojoba, jatrofa, macadamia, nueces de Brasil, y aguacate. La
15 cantidad de aceite agregado al lisado es típicamente mayor a 5% (medido por v/v y/o p/P) del lisado con el cual se combina el aceite. Así, un v/v o p/p preferido del aceite es mayor a 5%, o al menos 6%, al menos 7%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al
20 menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, y al menos 95% del lisado celular.

Los lípidos también pueden ser extraídos de un lisado mediante un procedimiento de extracción sin solvente sin un uso
25 sustancial o sin uso de solventes orgánicos o aceites mediante

enfriar el lisado. En tales métodos, el lisado es producido preferiblemente mediante tratamiento con ácido en combinación con la anterior temperatura ambiente. La sonicación también puede ser usada, particularmente si la temperatura está entre
5 temperatura ambiente y 65°C. Tal lisado bajo centrifugación o asentamiento puede ser separado en capas, una de las cuales es una capa acuosa: lípido (la capa "emulsión"). Otras capas pueden incluir un grano sólido, una capa acuosa, y una capa de lípidos. Los lípidos pueden ser extraídos de la capa emulsión
10 mediante congelar y descongelar o sino enfriar la emulsión de otra forma. En tales métodos, no es necesario agregar ningún solvente orgánico o aceite. Si algo de solvente orgánico o aceite es agregado, este estará en menos del 5% v/v o p/p del lisado.

15

Los lípidos separados o extraídos se someten entonces a una reacción de hidrólisis alcalina como se describió antes, en la cual la cantidad de base agregada a la mezcla de reacción puede ser adaptada para saponificar una cantidad deseada de los
20 constituyentes glicerolípidos y esteres de ácidos grasos de la composición de lípidos. Una aproximación o cuantificación cercana de la cantidad de lípido esterificado en la composición puede ser usada para adaptar la cantidad de base necesaria para saponificar una porción especificada del aceite, suministrando
25 así una oportunidad para modular la cantidad de aceite sin

saponificar restante en la composición resultante. En algunas modalidades, al menos 1%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 6%, al menos 7%, al menos 8%, al menos 9% o al menos 10% del aceite, en peso, permanece sin
5 saponificar en la composición resultante. En otras modalidades, puede ser deseable saponificar todo o sustancialmente todo el aceite, de modo que la composición resultante contenga no más de 10%, no más de 9%, no más de 8%, no más de 7%, no más de 6%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no más
10 de 1%, o no más de 0,5%, de aceite sin saponificar en peso.

En varias modalidades de la invención, la biomasa microbiana o aceite puede contener lípidos con longitudes variables de cadenas de carbonos, y con niveles de saturación
15 variables. Las características de los lípidos pueden resultar de los perfiles de glicerolípidos naturales de la una o más poblaciones de microorganismos usados para generar la biomasa o el aceite sometido a la reacción de saponificación, o pueden ser el resultado del camino por ingeniería de lípidos, como se
20 describió aquí, en el cual las cepas transgénicas de los microorganismos que producen lípidos particulares en mayor proporción son producidas.

La biomasa microbiana sometida a transesterificación
25 u otra modificación química, como se describió aquí, puede ser

sometida opcionalmente a un proceso de previo enriquecimiento que incremente la proporción de lípidos respecto del peso seco de los microbios. En algunas modalidades, la proporción de lípidos a materiales no lípidos en la biomasa se incremente en

5 más de 10%, en más de 20%, en más de 30%, en más de 40%, en más de 50%, en más de 60%, en más de 70%, en más de 80%, en más de 90%, o en más de 100% en peso. En algunos métodos de la invención, la biomasa es sometida a la reacción química sin una etapa previa de enriquecimiento, o, en algunas modalidades, sin

10 una etapa previa de enriquecimiento que incremente la proporción en más del 50%. El enriquecimiento de la proporción de lípidos a material no lípido puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, la adición de lípidos obtenidos de una fuente distinta a la biomasa microbiana (por ej., de un segundo

15 cultivo de biomasa microbiana, de una planta o fuente de semilla de aceite, o similar). El que se someta o no a enriquecimiento opcional, el componente lípido comprende no más de 50%, no más de 60%, no más de 70%, no más de 80%, no más de 90%, o no más de 95%, de la biomasa sometida a la reacción

20 química, y preferiblemente el componente lípido comprende no menos de 15%, no menos de 20%, no menos de 30%, no menos de 35%, no menos de 40%, o no menos de 45%, de la biomasa. En algunas modalidades, la biomasa cosechada comprende un contenido de lípidos de al menos 5%, al menos 10%, al menos

25 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al

menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, o al menos 90% por DCW.

5 En algunas modalidades, el agua es removida de la biomasa antes de someter la biomasa a la reacción de saponificación (u otra modificación química). En algunas modalidades de la invención, la biomasa microbiana no se somete a ningún tratamiento, diferente a remover el agua y/o lisis,
10 antes de someter la biomasa a la reacción de saponificación (u otra modificación química). En algunas modalidades, la biomasa sometida a la reacción química contiene componentes distintos a agua en las mismas proporciones relativas de la biomasa en el punto de cosecha de la fermentación. En este contexto, "las
15 mismas proporciones relativas" significa que las proporciones de los componentes permanecen sustancialmente iguales después de sucedidos los cambios asociados con el uso celular o la conversión metabólica de algunos componentes dentro de la biomasa cosechada (sin la aplicación de reactivos o
20 catalizadores exógenos), el escape de gases desde la biomasa cosechada, y/o modificaciones similares de las proporciones relativas que no son fácilmente controlables. La frase " las mismas proporciones relativas" también significa tener presente algún nivel de variabilidad experimental, por ej., $\pm 5\%$.

En algunos métodos de la invención, el lípido modificado covalentemente es separado de otros componentes de la biomasa luego de la modificación química del lípido. En algunas modalidades, separar el lípido comprende una separación de fases por lo cual los lípidos modificados covalentemente forman una fase no acuosa más liviana y los componentes de la biomasa forman una o más fases más pesadas. La fase no acuosa más liviana puede entonces ser removida para aislar los componentes de lípidos modificados covalentemente. En algunas modalidades, la separación de la fase lipofílica que contiene los lípidos modificados covalentemente del material celular hidrofílico de la biomasa puede facilitarse mediante centrifugación u otras técnicas. La proporción de los lípidos modificados covalentemente con respecto a la biomasa de la cual se separan puede estar ente 10% de lípidos a 90% de biomasa y 90% lípidos a 10% de biomasa en peso seco.

4. Ventajas de la biomasa con contenido de aceite saturado más alto y menos impurezas coloreadas.

20

Aunque la biomasa y/o aceite extraído usados en los métodos de saponificación descritos aquí pueden ser derivados de uno cualquiera de un número de microorganismos con perfiles de glicerolípido variables y proporciones variables de otros constituyentes tales como pigmentos, en una modalidad

preferida, la biomasa y/o el aceite extraído comprende una proporción relativamente alta de ácidos grasos saturados dentro de las TAG y una proporción relativamente baja de constituyentes que imparten un color al aceite (por ej., pigmentos). En una modalidad, la biomasa y/o el aceite extraído se derivan de microalgas del género *Prototheca*.

Las características de saturación de los constituyentes de ácidos grasos de un aceite saponificado, lo mismo que la presencia de constituyentes coloreados, impactan la vida en almacenamiento de las composiciones que comprenden aceite saponificado, al igual que sus cualidades estéticas. Los ácidos grasos saturados son menos propensos a la oxidación que sus contrapartes no saturadas. Así, el uso de aceites saponificados con una proporción relativamente más alta de constituyentes de ácidos grasos saturados: no saturados en la preparación de productos de aceite saponificado resulta en una vida de almacenamiento en general más larga y minimiza el desarrollo de productos de oxidación, los cuales frecuentemente tienen un olor desagradable. Similarmente, la ausencia relativa de impurezas coloreadas, las cuales, luego de oxidarse tienden a cambiar la apariencia de la composición de aceite saponificado en la cual están incorporadas, mejora las cualidades estéticas de la composición y la satisfacción del consumidor con tales productos, particularmente con una vida de

almacenamiento extendida. Los consumidores del jabón resultante tienden a asociar un color particular o la ausencia de color con una marca de jabón y esperan el mismo color del producto cada vez. La ausencia de color en el aceite saponificado
5 permite más consistencia en el aceite saponificado resultante.

Proporciones más altas de ácidos grasos saturados son particularmente ventajosas en la preparación de composiciones saponificadas, discutidas más adelante, en las cuales una
10 porción de los glicerolípidos en la biomasa (o el aceite extraído) permanece sin saponificar. Como se discutió antes, un porcentaje de los glicerolípidos puede permanecer sin modificación (no saponificado) mediante ajustar la cantidad de base usada en la reacción de saponificación, produciendo así un
15 producto de jabón que retiene alguna proporción de los glicerolípidos presentes originalmente. La presencia de un exceso de glicerolípidos en una reacción de saponificación se llama comúnmente "superengrasante". Los aceites extra
permanecen en el producto luego que la reacción de
20 saponificación imparte propiedades humectantes a la composición, pero como cualquier aceite, está sujeto a oxidación, lo que conduce al desarrollo de una composición que huele mal. El uso de una proporción más alta de constituyentes de ácidos grasos saturados: no saturados como componentes
25 "superengrasantes" de la mezcla de reacción resulta en un

producto con una vida de almacenamiento relativamente más larga y minimiza la producción de productos oxidativos malolientes.

En varias modalidades, los constituyentes de ácidos grasos saturados comprenden entre 1 - 100% de componentes lípidos que contienen éster de la biomasa microbiana o aceite extraído sometido a una reacción de hidrólisis alcalina de acuerdo con los métodos de la presente invención. En modalidades preferidas, los constituyentes de ácidos grasos saturados comprenden al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99%, de componentes lípidos que contienen éster en la reacción de hidrólisis alcalina.

En algunas modalidades, las impurezas generadoras de color (por ej., carotenoides) están presentes en la biomasa microbiana o el aceite extraído en una concentración de no más de 500 ppm, no más de 250 ppm, no más de 100 ppm, no más de 75 ppm, o no más de 25 ppm. Las impurezas generadoras de color incluyen carotenoides tales como luteínas, beta caroteno, zeaxantina, astaxantina y clorofila. En otras modalidades, la cantidad de clorofila que está presente en la biomasa microbiana o el aceite extraído es menor a 0,1 mg/kg, menor a 0,05 mg/kg, o menor a 0,01 mg/kg.

En algunas modalidades, el aceite o jabón microbiano, antes o después de la saponificación, respectivamente, contiene menos de 60 microgramos, menos de 59 microgramos, menos de 58 microgramos, menos de 57 microgramos, menos de 56 microgramos, menos de 55 microgramos, menos de 54 microgramos, menos de 53 microgramos, menos de 52 microgramos, menos de 51 microgramos, menos de 50 microgramos, menos de 49 microgramos, menos de 48 microgramos, menos de 47 microgramos, menos de 46 microgramos, menos de 45 microgramos, menos de 44 microgramos, menos de 43 microgramos, menos de 42 microgramos, menos de 41 microgramos, menos de 40 microgramos, menos de 39 microgramos, menos de 38 microgramos, menos de 37 microgramos, menos de 36 microgramos, menos de 35 microgramos, menos de 34 microgramos, menos de 33 microgramos, menos de 32 microgramos, menos de 31 microgramos, menos de 30 microgramos, menos de 29 microgramos, menos de 28 microgramos, menos de 27 microgramos, menos de 26 microgramos, menos de 25 microgramos, menos de 24 microgramos, menos de 23 microgramos, menos de 22 microgramos, menos de 21 microgramos, menos de 20 microgramos, menos de 19 microgramos, menos de 18 microgramos, menos de 17 microgramos, menos de 16 microgramos, menos de 15 microgramos, menos de 14 microgramos, menos de 13 microgramos, menos de 12 microgramos, menos de 11 microgramos, menos de 10 microgramos, menos de 9 microgramos, menos de 8 microgramos, menos de 7 microgramos, menos de 6 microgramos, menos de 5 microgramos, o menos de 4 microgramos de

carotenoides por gramo de aceite saponificado.

Las microalgas del género *Prototheca*, que incluyen sin limitación, *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca stagnora*,
5 *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis*, y *Prototheca zopfii*, producen naturalmente proporciones más altas de constituyentes de lípidos saturados, como se ilustró en el ejemplo 28. Más aún, los aceites extraídos de microalgas del género *Prototheca* incluyen generalmente menos impurezas
10 generadoras de color, permitiendo la producción de composiciones sin color que comprenden aceites saponificados. Así, se prefiere el uso de tales microorganismos como fuente de biomasa o aceite para practicar los métodos de saponificación de acuerdo con la presente invención.

15

VI. COMPOSICIONES

La presente invención también suministra composiciones que pueden ser preparadas por los métodos
20 descritos aquí. En cada una de las varias composiciones de la presente invención, la biomasa microbiana es seleccionada del grupo que consiste de bacterias, cianobacterias, microalgas eucarióticas, levadura oleaginosa, y hongos. En algunas modalidades, la biomasa microbiana es seleccionada de biomasa
25 derivada de microbios en el grupo que consiste de las

microalgas eucarióticas listadas en la Tabla 1. En algunas modalidades, la biomasa microbiana es una especie del género *Chlorella*, y en algunas modalidades, la especie es seleccionada del grupo que consiste de *Chlorella fusca*, *Chlorella*
5 *protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella ellipsoidea*. En una modalidad, la especie es *Chlorella protothecoides*. En algunas modalidades, la biomasa microbiana es derivada de una levadura seleccionada del
10 grupo que consiste de las levaduras oleaginosas listadas en la Tabla 2, o es derivada de un hongo seleccionado del grupo que consiste de los hongos listados en la Tabla 3.

En una modalidad, la presente invención está dirigida
15 a una composición que comprende una fase más liviana que contiene esteres de alquilo ácido graso y al menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana.

En varias modalidades de la composición, al menos 20%
20 de los esteres de alquilo ácido graso son C18. En otras modalidades, al menos 30%, al menos 40%, o al menos 50% de los esteres de alquilo ácido graso son C18. En algunas modalidades, al menos 50% de los esteres de alquilo ácido graso son C16 o de longitudes de cadena más largas. En algunas modalidades, al
25 menos 10% de los esteres de alquilo ácido graso son C14 o de

longitudes de cadena más cortas. En algunas modalidades, al menos 20% de los esteres de alquilo ácido graso son C14 o de longitudes de cadena más cortas.

5 En algunas modalidades, la composición comprende heteroátomos en cantidades variables. En algunas modalidades, la cantidad de calcio y magnesio combinados en peso en la fase más liviana no es mayor a 5 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad de fósforo en la fase más liviana no
10 es mayor a 0,001% en masa. En algunas modalidades, la cantidad de azufre en la fase más liviana no es mayor a 15 partes por millón. En algunas modalidades, la cantidad de potasio y sodio combinados en peso en la fase más liviana no es mayor a 5 partes por millón. En algunas modalidades, el contenido total
15 de carotenoides de la fase más liviana no es mayor a 100 microgramos de carotenoide por gramo.

 En otra modalidad, la presente invención suministra una composición que comprende la fase más liviana que contiene
20 lípidos completamente saturados, y al menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana.

 Aún en otra modalidad, la presente invención suministra una composición que comprende una fase más liviana
25 que contiene lípidos y al menos una fase más pesada que

contiene biomasa microbiana de más de una especie o cepa. Aún en otra modalidad, la presente invención suministra una composición que comprende una fase más liviana que contiene lípidos hydroxilados y al menos una fase más pesada que
5 contiene biomasa microbiana. En otra modalidad, la presente invención suministra una composición que comprende una fase más liviana que contiene ácidos grasos libres y al menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana.

10 Aún en otra modalidad, la presente invención suministra una composición que comprende aceites saponificados derivados de la hidrólisis alcalina de biomasa producida mediante cultivar una población de microbios, como se describió antes. En algunas modalidades, la biomasa de la cual se derivan
15 los aceites saponificados comprende una mezcla de biomasa de dos o más cepas o especies distintas de microbios que han sido cultivadas separadamente. En una modalidad, al menos dos de las cepas o especies distintas de microbios, la biomasa de las cuales es combinada, comprende perfiles de glicerolípidos
20 diferentes. En diferentes modalidades, la composición puede ser un sólido (lo que incluye polvo) o un líquido.

Las composiciones de aceite saponificado de la invención pueden incluir sales de ácidos grasos derivados de
25 una o más especies de microorganismos, como se describió aquí,

y puede incluir carotenoides u otros componentes derivaos directamente de la biomasa de la cual los aceites saponificados fueron preparados. En algunas modalidades, las composiciones de aceite saponificado incluyen, sin limitación, β -caroteno, α -caroteno, astaxantina, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína, licopeno, fitoeno, fitoflueno, y/o zeaxantina. En algunas composiciones, las composiciones de aceite saponificado incluyen un polisacárido de algas, tal como aquellos descritos en la publicación internacional número WO/2007/084769, incorporada aquí como referencia.

En algunas modalidades, las composiciones de aceite saponificado comprenden varias proporciones de glicerolípidos no saponificados derivados de la biomasa. En varias modalidades, los glicerolípidos no saponificados derivados de la biomasa comprenden al menos 2%, al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, o al menos 50% de la composición de aceite saponificado. En otras modalidades, los glicerolípidos no saponificados comprenden no más de 25%, no más de 20%, no más de 15%, no más de 10%, no más de 9%, no más de 8%, no más de 7%, no más de 6%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, o no más de 1% de la composición de aceite saponificado.

En varias modalidades de las composiciones de aceite

saponificado de acuerdo con la invención, el aceite saponificado comprende al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% de la masa total de la composición. En algunas modalidades, el aceite saponificado comprende no más de 80%, no más de 75%, no más de 70%, no más de 65%, no más de 60%, no más de 55%, no más de 50%, no más de 45%, no más de 40%, no más de 35%, no más de 30%, no más de 25%, no más de 20%, no más de 15%, no más de 10%, o no más de 5% de la masa total de la composición. En algunas modalidades, los componentes derivados de la biomasa, que incluyen sin limitación, aceites saponificados, aceites no saponificados, carotenoides, y similares, constituyen al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% de la masa total de la composición. En otras modalidades, los componentes derivados de la biomasa comprenden no más de 80%, no más de 75%, no más de 70%, no más de 65%, no más de 60%, no más de 55%, no más de 50%, no más de 45%, no más de 40%, no más de 35%, no más de 30%, no más de 25%, no más de 20%, no más de 15%, no más de 10%, o no más de 5% de la masa total de la

composición.

En algunas modalidades de la composición de aceite saponificado, la composición incluye además al menos un aceite
5 seleccionado de soya, colza, canola, palma, palma de almendra, coco, maíz, aceite vegetal de desecho, sebo chino, aceitunas, girasol, semilla de algodón, grasa de pollo, sebo de res, sebo porcino, microalgas, macroalgas, *Cuphea*, lino, maní, grasa blanca escogida (manteca de cerdo), mostaza de nuez de semilla
10 de marañón *Camelina sativa*, avena, lupino, kenaf, caléndula, cáñamo, café, linaza, avellana, euforbia, semilla de calabaza, cilantro, camelia, ajonjolí, cártamo, arroz, árbol de aceite de tung, cacao, copra, cachorro de pium, granos de ricino, nuez, jojoba, jatrofa, macadamia, nueces de Brasil, y aguacate.

15

En algunas modalidades de la composición de aceite saponificado, uno o más aditivos son combinados con las sales de ácidos grasos. En algunas modalidades, los aditivos son seleccionados para optimizar la eficiencia de la limpieza de la
20 composición cuando es usada, por ejemplo, como limpiador de la piel. En otras modalidades, los aditivos son seleccionados con respecto a una característica impartida por el aditivo a la composición que atrae a un consumidor. En algunas modalidades, los aditivos son seleccionados tanto para la optimización de la
25 eficiencia en limpieza y para atraer al consumidor. En las

varias modalidades, los aditivos son seleccionados de aceites
esenciales, aceites de fragancia, aceites con aroma, botánicos,
extractos, extractos de CO₂, arcillas, colorantes, dióxido de
titanio, micas, hierbas colorantes, escarchas, exfoliantes,
5 semillas de frutos, fibras, polvos de granos, alimentos de
nueces, alimentos de semillas, perlas de aceite, perlas de
cera, hierbas, hidrosoles, vitaminas, polvos de leche,
preservativos, antioxidantes, tocoferoles, sales, azúcares,
aceites vegetales, ceras, glicerina, vegetales marinos, aceites
10 nutritivos, aceites humectantes, mantequillas vegetales,
propilenglicol, parabenos, miel, cera de abejas, aloe,
polisorbato, almidón de maíz, polvo de cacao, polvo de coral,
humectantes, gomas, agentes emulsificadores, y espesantes.
Estos aditivos están disponibles comercialmente de un número de
15 proveedores de ingredientes para el cuidado de la piel y
accesorios para el baño.

Los aceites esenciales incluyen pimienta de Jamaica,
amyris, raíz de angélica, semilla de anís, albahaca, laurel,
20 bergamota, pimienta negra, melaleuca, alcanfor, cananga,
cardamomo, semilla de zanahoria, casia, hierba gatera, madera
de cedro, manzanilla, corteza de canela, hoja de canela,
citronela java, salvia, botón de clavo, cilantro, menta,
ciprés, davana, semilla de eneldo, elemí, eucalipto, hinojo,
25 abeto, incienso, borbón de geranio, asado de geranio, geranio,

jengibre, rosado de uva, uva, bálsamo de gurjurn, hisopo, bayas de enebro, lavandina, lavándula, lavanda, mirto de limón, árbol de té de limón, limón, limonaria, tilo, litsea cubeba, mandarina, mejorana, gordolobo, mirra, neroli, nerolina, niaulí, nuez moscada, naranja, palmarosa, pachulí, hierbabuena, petit grain, aguja de pino, ravensara, ravintsara, rosalina, rosa, romero, palo de rosa, salvia, sándalo, menta verde, nardo, anís de estrella, tangerina, árbol de té, tomillo, tulsi, verbena, vetiver, ylang ylang y zdravest, o combinaciones de estas.

Los aceites de aroma y fragancia incluyen tulipán, almendra, amaretto, ámbar, Anais, manzana, canela de manzana, especias de manzana, melocotón, crema de melocotón, almizcle árabe, pera asiática, flor de ciruelo asiático, maderas de otoño, banano, albahaca, nectarina de albahaca, ron de laurel, baya de laurel, bergamota, bayas y crema, ponqué de cumpleaños, cereza negra, té negro, té de mora, grosella negra, nilo azul, delicia de arándano, preservados de zarzamora, azúcar morena, chicle, crema de mantequilla, caramelo, lirio de cala, cantalupo, manzana acaramelada, clavel, ponqué de zanahoria, té chai, chamomila, almizcle chino, lluvia china, peonía china, crisantemo, canela, coco, crema de coco, algodón dulce, arándano agrio, pepino cohombro, melón cohombro, narciso, diente de león, espuela de caballero, mora ártica, dulce de

leche, té gris de conde, galletas de pascua, ponche de huevo,
 almizcle egipcio, bosque encantado, lavanda inglesa, pera
 inglesa, hojas perennes, higo, frangipani, frankcense, vainilla
 francesa, manzana fresca, café recién preparado, ponche de
 5 frutas, gardenias, geranios, lirio de jengibre, pan de
 jengibre, uva, fruto de uva, manzana verde, pasto verde, té
 verde, guayaba, flor de guayaba, jengibre blanco hawaiano,
 heliotropo, cáñamo, herbáceas, ponqué de frutos festivo, baya
 del acebo, jengibre de miel, miel, madreselva, jazmín, té de
 10 jazmín, bayas de enebro, kiwi, lavanda, cuero, limón, limón
 perejil, lila, cal, frambueso, flor de loto, magnolia,
 mandarina, mango, mango y kiwi, arce, leche chocolate, mimosa,
 cal mentolada, morera, mirra, nerolí, musgo de roble, avena,
 lluvia ocan, flor del naranjo, sorbete de naranja, vainilla de
 15 naranja, papaya, fruta de la pasión, pachulí, melocotón,
 melocotones y crema, pearberry, menta, pikaki, piña colada,
 piña, granada, torta de calabaza, uvas pasas y almendras,
 frambuesa, nueces tostadas, palo de rosa, sage, sándalo,
 sasafrás, musgo marino, ajonjolí, pino siberiano, bayas de la
 20 nieve, musgo español, especies, fresa, ciruela dulce, loción
 para bronceado, clavo dulce, hierba dulce, arveja dulce,
 tangerina, coco thai, madera, hoja del tomate, vainilla, melón,
 chocolate blanco, cereza silvestre, glicinia, cerveza de las
 brujas, y ylang ylang, o combinaciones de estos.

Los exfoliantes incluyen partículas que pueden ser usadas para eliminar células muertas de la piel, suciedad, u otros materiales de la superficie de la piel, e incluyen sin limitación, semillas de frutos y fibras, polvos de granos, alimentos de nueces y semillas, y perlas de aceite o cera. Las fibras de frutos incluyen arándano, arándano agrio, uva, kiwi, frambuesa, mora, fresa, y similares. Los polvos de granos incluyen polvo de avena, y polvo de almendra, o similares, molidos a diversos grados de tamaño de partícula. Perlas de polímero, tales como aquellas hechas de polietileno, o similares, también pueden ser usadas. LA remoción de células muertas de la piel y/o la capa de piel más exterior pueden suministrar una oportunidad para que los agentes bioactivos, tales como los carotenoides, los cuales también están presentes en las composiciones de la invención, tengan mayor acceso a capas más profundas de la piel.

Los extractos y extractos de CO₂ incluyen extractos herbales derivados de procedimientos de extracción convencionales, o mediante el uso de dióxido de carbono liquificado. Las hierbas incluyen la hoja de aloe vera, hoja de alfalfa, raíz de alheña, semilla de achiote, arrurruz, raíz de bardana, pétalos de caléndula, raíz de zanahoria, flor de charnomile, hoja de cornfrey, barba de maíz, amapolas azules holandesas, semilla de hinojo, raíz de jengibre, ginseng, hoja

de té verde, flor de jazmín, bayas de enebro, botones de lavanda, piel de limón, limonaria, raíz de malvavisco, ortigas, pitillos de avena, cáscara de naranja, paprika, perejil, hoja de menta, botones de rosa, pétalos de rosa, rosa mosqueta, hoja
5 de romero, shavegrass, hoja de hierbabuena, mosto de St. John, y combinaciones de estos.

Los colorantes y abrillantadores incluyen verde # 5, verde #8, naranja #4, rojo #22, rojo #33, violeta #2, azul #1,
10 verde #3, rojo #40, amarillo #5, amarillo #6, verde #6, rojo #17, al igual que micas con lustre de perla y hierbas colorantes tales como la hija de henna, sándalo, cúrcuma, arándano agrio, kiwi, frambuesa, alheña, achiote, raíz de zanahoria, ortiga, paprika, y perejil.

15

En varias modalidades, la composición de aceite saponificado que contiene uno o más aditivos, como se describe anteriormente, es formulada para uso como producto cosmético. En algunas modalidades, el producto cosmético es un producto de
20 higiene personal, tal como una composición de limpieza para uso en el cuerpo o parte el cuerpo del individuo del mismo (por ejemplo, cara, piernas, etc.)

En un aspecto, la invención es concerniente con un kit que comprende una composición de aceite saponificado, como
25 se describe en la presente, y un complemento oral. En una

modalidad, el complemento oral es una vitamina. En otra modalidad, el complemento oral es una hierba.

En otro aspecto, la invención es concerniente con un método para usar aceite saponificado derivado de la hidrólisis alcalina de biomasa, producida como se describe en la presente, para mezcla con uno o más aditivos, como se describe anteriormente, y empaque de la mezcla como un producto cosmético. En una modalidad, el producto cosmético comprende una composición de limpieza (por ejemplo, un limpiador facial).

Métodos de análisis de ADN convencionales pueden ser usados para detectar la presencia de componentes derivados de biomasa microbiana de acuerdo con la presente invención.

Todas las referencias citadas en la presente, en las que se incluyen patentes, solicitudes de patente y publicaciones, son incorporadas por medio de la presente por referencia en su totalidad, sin consideración si fueron específicamente incorporados previamente. 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 con arte previo en relación con la invención descrita en la presente. En particular, las siguientes solicitudes de patente son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad para todos los propósitos. Solicitud

provisional estadounidense No. 61/043,620 presentada el 9 de abril de 2008, intitulada "Direct Chemical Modification of Microbial Biomass", solicitud provisional estadounidense No. 61/074,610, presentada el 20 de junio de 2008, intitulada
5 "Soaps and Cosmetic Products Produced from Oil-Beannng Microbial Biomass and Oils", publicación internacional número WO 2008/151149, y solicitud provisional estadounidense No. 61/112,464 presentada el 7 de noviembre de 2008, intitulada "Cosmetic Compositions Comprising Microalgal Components".

10 Aunque esta invención ha sido descrita en relación con modalidades específicas de la misma, se comprenderá que es apta de modificaciones adicionales. Variaciones, usos o adaptaciones de la invención que siguen en general, los principios de la invención y que incluyen tales desviaciones de
15 la presente revelación como entren dentro de la práctica conocida o acostumbrada en el arte con el cual la invención es concerniente y como puedan ser aplicados a los elementos esenciales resumidos anteriormente en la presente, están incluidos en el alcance de las reivindicaciones a continuación.
20 Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no limitar la invención reivindicada.

VII. EJEMPLOS

EJEMPLO 1

25 A no ser que se indique de otra manera, todas las

cepas descritas en este y los siguientes ejemplos fueron obtenidas de la Colección de Cultivo de Algas en la Universidad de Texas (Austin, TX). En este ejemplo, cepas de *Chlorella* fueron probadas para cultivos 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 de medios sólidos a 25 ml de medio base líquido (2 g/l de extracto de levadura, NaNO_3 2.94 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM, K_2HPO_4 0.4 mM, KH_2PO_4 1.28 mM, NaCl 0.43 mM) y cultivadas con agitación a 27°C por 72 horas bajo una intensidad de luz de $75 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Estos cultivos fueron usados para inocular cada cepa a una densidad final de 1×10^5 células por ml a placas de 24 cavidades que contienen 2 ml de (a) medio base solamente, (b) medio base más 0.1% de glucosa y (c) medio base más 0.5% de glicerol grado reactivo (EM Science, catálogo # GX0185-6). Las placas fueron colocadas en la oscuridad y cultivadas por 72 horas con agitación a 27°C. Las muestras de cada cepa cultivadas en las tres condiciones fueron diluidas 1.9:1 en H_2O destilada y la absorbancia fue leída a 600 nm en un dispositivo Molecular Devices SpectraMax 340PC. Todas las cepas exhibieron crecimiento en presencia de glucosa y glicerol en comparación con el medio de solamente base.

EJEMPLO 2

Cepas y Medios: *Chlorella protothecoides* #1 (CEPA 250), #2 (CEPA 264) y *Chlorella kessleri* #1 (CEPA 398) cultivos
 5 concentrados fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado. El medio de Proteosa modificado consistía (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 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2 g de extracto de levadura por litro. Los desperdicios de glicerol de la producción de
 10 biodiesel (glicerol acidulado (AG) y glicerol no acidulado (NAG)) fueron obtenidos de Imperial Western Products (Selma, CA, EUA). El glicerol "puro" o "grado reactivo" fue de EM Science (una división de Merck KGA), catálogo # GX0185-6. Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue
 15 preparado en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + 1% de glicerol puro
2. Proteosa + 1% de glicerol acidulado
3. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular
4. Proteosa + 1% de glicerol puro + 1% de glucosa
 20 (agregada después de 72 h)
5. Proteosa + 1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa (agregado después de 72 h)
6. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de glucosa (agregado después de 72 h)
- 25 Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a 5×10^5

células/ml de concentración. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y fueron agitados mediante agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Después de 72 h de cultivo inicial, se agregó 1% (peso/volumen) a las muestras #4, 5 y 6 y las células fueron cultivadas otras 24 horas. Para medir el DCW, 1 ml de cada cultivo fue aglomerado mediante centrifugación a 5,000 rpm por 5 minutos en una centrifuga Eppendorf 5415C. Después de remover el sobrenadante, las pelotillas celulares fueron congeladas a -80°C y liofilizadas en una secadora por congelación a escala de laboratorio (Labconco, MO, EUA). 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) cultivos concentrados fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado (véase Ejemplo 2). Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + 1% de glicerol puro + 1% de glucosa
2. Proteosa + 1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
3. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de glucosa

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes 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, Reino Unido de la gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 96 horas, el crecimiento celular fue medido mediante DCW (véase Ejemplo 2). Los resultados son mostrados en la Figura 2.

EJEMPLO 4

10 Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Chlorella protothecoides* #3 (CEPA 249), #4 (CEPA 31), y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado (véase EJEMPLO 2)- Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24
15 cavidades.

1. Proteosa + 1% de glicerol puro + 1% de glucosa
 2. Proteosa + 1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
 3. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de glucosa
- 20

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen 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 mediante agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430
25

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, 5 µl de células lavadas y 200 µl de ácido sulfúrico (18 M) fueron agregados. Los tubos fueron incubados a 90°C en un baño de agua por 30 minutos y se agregó 1 ml de ácido fosfórico-reactivo de vanillina a los tubos e incubados a 37°C por 15 minutos. Para preparar el reactivo de ácido fosfórico-vanillina, 0.12 g de vanillina fueron agregados a 20 ml de agua, y el volumen 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.

15 **EJEMPLO 5**

Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Chlorella protothecoides* #2 (CEPA 264) y *Chlorella kessleri* #1 (CEPA 398) fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado (véase Ejemplo 2). Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fueron preparados en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + 1% de glicerol puro
2. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular
3. Proteosa + 1% de glicerol puro + 1% glucosa (agregado después de 72 horas)
- 25 4. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de

glucosa (agregado después de 72 horas).

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen gliceroles diferentes (puro o sin acidular) a una concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 72 horas de crecimiento inicial, se agregó 1% de glucosa a la muestra #3 y #4 y las células fueron cultivadas otras 24 horas. El contenido de lípidos fue medido en todas las muestras (véase Ejemplo 4). La densidad óptica a 600 nm fue también medida para verificar la absorbancia no específica y restada de OD 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: Cultivos concentrados de *Chlorella protothecoides* #3 (CEPA 249) y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado (véase Ejemplo 2). Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

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

glucosa (agregado después de 72 horas)

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

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen
 5 gliceroles diferentes (puro, acidulado o sin acidular) a una
 concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron
 mantenidos en la oscuridad y agitados por agitador orbital de
 Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm.
 Después de 72 horas de cultivo inicial, se agregó 1% de glucosa
 10 y las células fueron cultivadas otras 24 horas. El DCW y
 contenido de lípido fueron medidos en todas las muestras
 (véanse Ejemplos 2 y 5). El porcentaje de lípido fue calculado
 de la cantidad de lípido total dividida por el DCW. Los
 resultados son mostrados en la Figura 5.

15

EJEMPLO 7

Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Chlorella*
protothecoides #2 (CEPA 264) y *Chlorella kessleri* #1 (CEPA 398)
 20 fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado (véase
 Ejemplo 2). Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios
 diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

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

25 2. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de

glucosa (agregado después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios que contienen ya sea glicerol 1% puro o glicerol 1% sin acidular a una concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 72 horas de cultivo inicial, se agregó 1% de glucosa y las células fueron cultivadas otras 24 horas. El DCW y contenido de lípido fueron medidos en todas las muestras (véanse Ejemplos 1 y 4). El porcentaje de lípido fue calculado de la cantidad de lípido total dividido por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la Figura 6.

EJEMPLO 8

Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Chlorella protothecoides* #1 (CEPA 250), #4 (CEPA 31) y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado (véase Ejemplo 2). Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + 2% de glucosa

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

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante agitador orbital

de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 96 horas de cultivo inicial, el contenido de lípido fue medido (véase Ejemplo 5). Los resultados son mostrados en la Figura 7.

5

EJEMPLO 9

Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Chlorella protothecoides* #3 (CEPA 249), #4 (CEPA 31) y *Chlorella kessleri* #1 (CEPA 398) fueron mantenidos sobre medio de Proteosa
10 modificado (véase Ejemplo 2). Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + 2% de glucosa
2. Proteosa + 1% de glicerol + 1% de glucosa
- 15 3. Proteosa + 1% de glicerol + 1% de glucosa
(agregado después de 72 horas).

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante agitador orbital
20 de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 72 horas de cultivo inicial, se agregó 1% de glucosa (peso/volumen) al medio #3 y las células fueron cultivadas otras 24 horas. El DCW y contenido de lípidos fueron medidos en todas las muestras (véase Ejemplos 2 y 5). El
25 porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de

lípidos total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la Figura 8.

EJEMPLO 10

5 Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Chlorella*
protothecoides #1 (CEPA 250), #3 (CEPA 249), y *Chlorella*
kessleri #2 (CEPA 397) fueron mantenidos sobre medio de
 Proteosa modificado (véase Ejemplo 2). Para cada cepa, 1 ml de
 los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24
 10 cavidades.

1. Proteosa + 1% de glicerol puro + 1% de glucosa
2. Proteosa + 1% de glicerol puro + 1% de glucosa
 (agregado después de 72 horas)
3. Proteosa + 1% de glicerol acidulado + 1% de
 15 glucosa
4. Proteosa + 1% de glicerol acidulado + 1% de
 glucosa (agregado después de 72 horas)
5. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de
 glucosa
- 20 6. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de
 glucosa (agregado después de 72 horas)

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una
 concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron
 mantenidos en la oscuridad y agitados mediante agitador orbital
 25 de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430

rpm. Después de 72 horas de cultivo inicial, se agregó 1% de glucosa (peso/volumen) a los medios #2, #4 y #6 y las células fueron cultivadas otras 24 horas. El contenido de lípido fueron medidos en todas las muestras (véase Ejemplo 4). Los resultados son mostrados en la Figura 9.

EJEMPLO 11

Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Chlorella protothecoides* #1 (CEPA 250), #3 (CEPA 249), #4 (CEPA 31) y *Chlorella kessleri* #2 (CEPA 397) fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado (véase Ejemplo 2). Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

1. Proteosa + 1% de glicerol puro + 1% de glucosa
- 15 2. Proteosa + 1% de glicerol puro + 1% de glucosa
(agregado después de 72 horas)
3. Proteosa + 1% de glicerol acidulado + 1% de
glucosa
4. Proteosa + 1% de glicerol acidulado + 1% de
20 glucosa (agregado después de 72 horas)
5. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de
glucosa
6. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de
glucosa (agregado después de 72 horas)
- 25 Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una

concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante agitador 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 los medios #2, #4 y #6 medios y las células fueron cultivadas otras 24 horas. El DCW fue medido en todas las muestras (véase Ejemplo 2). Los resultados son mostrados en la Figura 10.

10 **EJEMPLO 12**

Cepas y Medios: un cultivo concentrado de (a) *Spirulina platensis* (UTEX 2340) y (b) *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) de *Spirulina* fue mantenido en medio de *Spirulina* y *Navicula* fue mantenido en medio de extracto de suelo (SEM). El medio de *Spirulina* consistía de NaHCO_3 162 mM, Na_2CO_3 38 mM, K_2HPO_4 1.9 mM, NaNO_3 29 mM, K_2SO_4 5.75 mM, NaCl 17.1 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mM, Na_2EDTA 2 mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.36 mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.21 mM, ZnCl_2 0.37 mM, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0085 mM, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.017 mM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.78 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 μM , H_3BO_3 10 μM y vitamina B_{12} 0.001 mM. El medio de extracto de suelo consistía de NaNO_3 2.94 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM, K_2HPO_4 0.43 mM, KH_2PO_4 1.29 mM, NaCl 0.43 mM, 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, EUA). Para cada cepa, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

(a)

7. Medio de espirulina + 2% de glucosa

5 8. Medio de espirulina + 2% de glicerol grado reactivo

9. Medio de espirulina + 2% glicerol sin acidular

10. Medio de espirulina + 1% de glicerol sin acidular + 1% de glucosa

10 (b)

1. SEM + 2% de glucosa

2. SEM + 2% de glicerol grado reactivo

3. SEM + 1% de glicerol grado reactivo + 1% de glucosa

15 4. SEM + 2% de glicerol acidulado

5. SEM + 1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa

6. SEM + 2% de glicerol sin acidular

7. SEM + 1% de glicerol sin acidular + 1% de glucosa

20 Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) 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 μ l de cultivos fueron recolectados y lavados una vez con el mismo

25

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 de baño de agua por 30 minutos, y se agregó 1 ml de reactivo de ácido fosfórico-vanillina a los tubos y
5 fueron incubados a 37°C por 15 minutos. Para preparar el reactivo de ácido fosfórico-vanillina, 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
10 medida en una cubeta de vidrio contra un tubo de referencia con 5 µl de agua como muestra. La curva de referencia está compuesta de trioleína disuelta en cloroformo que fluctúa de 1 a 10 µg.

Para medir el DCW, 0.5 ml de cada cultivo fueron aglomerados mediante centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos.
15 Después de remover el sobrenadante, las pelotillas celulares fueron congeladas a -80°C y secadas de la noche a la mañana en un sistema de secado por congelación (Labconco, MO, EUA). El porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de lípido total dividida por el peso seco de célula. Los
20 resultados son mostrados en la Figura 11.

EJEMPLO 13

Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) fueron mantenidos sobre medio de Proteosa
25 modificado. El medio de Proteosa modificado consistía (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 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 2 g de extracto de levadura por litro. Para cada condición de cultivo, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24
5 cavidades

(a), (b)

1. Proteosa + 2% de glucosa
2. Proteosa + 2% glicerol
3. Proteosa + 2% de glicerol acidulado
- 10 4. Proteosa + 2% de glicerol sin acidular
5. Proteosa + 1% de glicerol sin acidular + 1% de glucosa

Scenedesmus armatus (UTEX 2552) fue inoculado a medios diferentes a una concentración 5×10^5 células/ml. Los
15 cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 96 horas, el cultivo celular fue medido mediante DCW y el contenido de lípido fue medido mediante análisis de fósforo-vanillina (véase Ejemplo 12). El
20 porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de lípido total dividido por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la Figura 12.

EJEMPLO 14

25 Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Navicula*

peliculosa (UTEX 667) fueron mantenidos sobre medio de extracto de suelo (véase Ejemplo 12). Para cada condición de cultivo, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

- 5 1. SEM + 2% de glucosa
2. SEM + 2% de glicerol
3. SEM + 2% de glicerol acidulado
4. SEM + 1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
5. SEM + 2% de glicerol sin acidular
- 10 6. SEM + 1% de glicerol sin acidular + 1% de glucosa

Navicula peliculosa (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 mediante

15 agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 96 horas, el cultivo celular fue medido por DCW (véase Ejemplo 12). Los resultados son mostrados en la Figura 13.

20 **EJEMPLO 15**

Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) y *Navicula peliculosa* (UTEX 667) fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado para *Scenedesmus armatus* y medio de extracto de suelo para *Navicula peliculosa*

25 (véase Ejemplo 1). Para cada cepa, 1 ml de los siguientes

medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

Scenedesmus armatus

5. Proteosa + 1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa

5 6. Proteosa + 1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa (agregado después de 72 horas)

Navicula peliculosa

1. SEM + 1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa

2. SEM + 1% de glicerol acidulado + 1% de glucosa
10 (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 agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después
15 de 72 horas de cultivo inicial, se agregó 1% glucosa a la muestra #2 y las células fueron cultivadas otras 24 horas. El cultivo celular fue medido mediante DCW (véase Ejemplo 12). Los resultados son mostrados en las Figuras 14 (a) y (b).

20 **EJEMPLO 16**

Cepas y Medios: Cultivos concentrados de *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado (véase Ejemplo 1). Para cada condición, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas
25 de 24 cavidades.

4. Proteosa
5. Proteosa + 0.5% de glucosa
6. Proteosa + 0.5% de xilosa
7. Proteosa + 0.25% de glucosa + 0.25% de xilosa

5 Se inoculó *Chlorella protothecoides* #4 (UTEX 31) a medios que contienen diferentes azúcares (glucosa o xilosa) a una concentración de 3×10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430
10 rpm. Después de 72 horas de cultivo, el cultivo celular fue medido al contar los números de célula de cada cultivo. Los resultados son mostrados en la Figura 15.

EJEMPLO 17

15 Cultivos concentrados de *Chlorella protothecoides* cepas #1, #3, y #4 fueron mantenidos sobre medio de Proteosa modificado (véase Ejemplo 1). Para cada condición, 1 ml de los siguientes medios diferentes fue preparado en placas de 24 cavidades.

- 20 1. Proteosa
2. Proteosa + 1% de glucosa
3. Proteosa + 1% de fructosa

 Cada cepa fue inoculada a medios que contienen diferentes azúcares (glucosa o fructosa) a una concentración de
25 1×10^6 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la

oscuridad y agitados por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 rpm. Después de 96 horas de cultivo, la densidad celular fue medida al contar el número de células de cada cultivo. Los resultados son mostrados en la

5 Figura 16.

EJEMPLO 18

Chlorella sobre Sacarosa

Chlorella protothecoides (UTEX 249) fue inoculada a

10 tres matraces de 50 ml de medio de Proteosa con 1% desacarosa (NaNO₃ 2.94 mM, K₂HPO₄ 0.428 mM, KH₂PO₄ 1.28 mM, NaCl 0.427 mM, CaCl₂•2H₂O 0.17 mM, MgSO₄•7H₂O 0.3 mM, proteosa peptona 1 g/l) a una densidad celular final de 4x10⁵ células por ml. Se agregó invertasa (Sigma #14504) a dos de los cultivos a 0.01 U/ml y

15 0.05 U/ml. Todos los tres cultivos fueron cultivados en la oscuridad por ~60 horas con agitación a 150 rpm. Se llevaron a cabo conteos de células finales sobre todos los tres cultivos después de ~60 horas de agitación en la oscuridad. El matraz testigo llegó a 44x10⁵ células por ml, mientras que los

20 matraces de 0.01 U/ml y 0.05 U/ml llegaron a densidades celulares de 1x10⁸ y 3x10⁸, respectivamente. Cada matraz fue verificado en cuanto a contaminación al final del experimento mediante análisis microscópico y todos estuvieron limpios.

25 **EJEMPLO 19**

Crecimiento de *Chlorella protothecoides* sobre Melasas con una Sacarosa Invertasa

Preparación de células de *Chlorella* para inoculación:

Un cultivo líquido de 10 ml de *Chlorella* fue iniciando tomando
 5 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 DCW.

Preparación de Melasas y Soluciones Concentradas de

10 Azúcar: Una solución concentrada al 5% fue preparada con
 glucosa, sacarosa y tres muestras de melasas diferentes
 (marcadas BS1, BS2 y HTM) obtenidas del procesamiento comercial
 de caña de azúcar a azúcar, como se muestra en la siguiente
 Tabla 6. El pH de todas las soluciones concentradas fue
 15 verificado para estar en el intervalo de 6-6.6, y luego las
 soluciones concentradas fueron sometidas a autoclave.

Tabla 6. Melasas y soluciones de azúcar

	Melasas	% de azúcar	Azúcar al 5% diluido en 100 ml
			Gramos o mililitros
20	HTM	78.72	6.4
	BS1 (FL)	44.25	11.3
	BS2 (AU)	51.55	9.7
	Sucrosa	100	5
	Glucosa	100	5

Preparación de Solución de Invertasa: Una solución
5 concentrada de 40 unidades/ml de invertasa fue preparada al
reconstituir 1 mg de una invertasa de 400 unidad/mg (Sigma) en
10 milímetros de agua destilada.

Condiciones Experimentales y Montaje: Se prepararon
cultivos de 10 ml, cada uno consiste de una concentración final
10 de melasas/azúcar de 1%, 0.05 unidades/ml de invertasa y
 1.0×10^6 células por ml de *Chlorella protothecoides* en un medio
de Proteasa base. Los cultivos fueron numerados como sigue: (1)
medio solamente testigo, (2) 1% de HTM, (3) 1% de BS1; (4) 1%
de BS2; (5) 1% de glucosa, y (6) 1% de sacarosa. Un montaje
15 testigo similar fue también preparado sin la adición de
invertasa. Los cultivos fueron cultivados en la oscuridad por
cinco días con agitación a 250 rpm a 28°C.

Resultados: El crecimiento de las células de
Chlorella protothecoides fue evaluado enseguida de los cinco
20 días de incubación en las respectivas materias primas en la
oscuridad. Como se muestra en las Figuras 19-20, las células
pueden ser cultivadas sobre melasas en presencia de una
sacarosa invertasa con rendimientos comparables a aquel del
cultivo sobre glucosa pura.

EJEMPLO 20**Generación de Biomasa de Alto Contenido de Aceite y Bajo Contenido de Aceite**

Materiales y Métodos: Biomasa de *Chlorella*
 5 *protothecoides* #1 (CEPA 250) para transesterificación fue
 cultivada heterotróficamente en presencia de glucosa como
 fuente de carbono fija como una fermentación por lotes,
 esencialmente como se describe en *Appl Microbiol Biotechnol* 78
 29-36 (2008). La muestra "LO-I" fue tomada durante el
 10 crecimiento exponencial (a 60 horas) y contiene un contenido de
 aceite similar a aquel obtenido con el crecimiento
 fotosintético. La muestra "080020-1" fue tomada a 115 horas,
 después que todo el nitrógeno en el cultivo había sido
 consumido y el cultivo había entrado a una fase de estado
 15 estable de acumulación de lípido.

Contenido de Lípido: Se determinó el contenido de
 lípido total del aceite (pre-transesterificación) mediante
 análisis de HPLC. Aproximadamente 10 mg de biomasa seca fueron
 mezclados con 1 ml de isopropanol saturado con KOH e incubado a
 20 80°C por 4 horas. Los lípidos de las pelotillas celulares
 fueron extraídos e hidrolizados utilizando una solución de
 isopropanol hidróxido de potasio calentada a 80°C por cuatro
 horas. Las muestras de extracto fueron analizadas con un HPLC
 Agilent 1100 utilizando el siguiente método. Las muestras
 25 fueron derivadas con bromuro de bromofenacilo (60 mg/ml) y

cargadas a una columna de Luna 5u C8(2) 100A 150x2 mm (Phenomenex). Las muestras fueron eluidas de la columna utilizando un gradiente de agua a 100% de acetonitrilo:tetrahidrofurano (95:5). Las señales fueron detectadas utilizando un detector de arreglo de DAD a una longitud de onda de 254 nm.

La muestra "LO-1" contenía 8.6% de aceite y la muestra "080020-1" contenía 28% de aceite.

10 **EJEMPLO 21**

Transesterificación Directa de Biomasa Microbiana

Proporción de Muestra: Pelotillas húmedas de biomasa que comprende bajo contenido de aceite y alto contenido de aceite, respectivamente, preparadas como se describe anteriormente, fueron liofilizadas. La biomasa seca de las muestras fue molida a un polvo burdo y secadas otras vez durante toda la noche a 55°C bajo vacío. Se determinó que el por ciento de humedad es de <3% para cada muestra utilizando un análisis de humedad Mettler Toledo.

20 Transesterificación: Metanol anhidro/NaOH 1N fue agregado a la biomasa seca (<3% de humedad) a una proporción de 1:5 en una botella de vidrio con tapa atornillada de 4 veces el volumen de la biomasa. Una barra agitadora fue colocada en la botella, que fue luego sellada herméticamente. La mezcla fue
25 agitada vigorosamente a 55°C por 7 horas. La biomasa fue

filtrada a través de papel filtro Whatmann y lavada con metanol hasta que el filtrado era claro. Todos los lavados fueron combinados en un matraz de globo con filtrado original y el metanol fue destilado utilizando un dispositivo rotovap. Se
5 agregó cloroformo (1 parte) y se mezcló bien y luego fue vertido a un embudo de separación. Luego se agregó metanol (2 partes) al matraz, se mezcló bien y fue agregado al embudo de separación. Luego se agregó agua DI (0.8 volúmenes) al matraz, fue mezclada y agregada al embudo de separación. El contenido
10 del embudo de separación fue agitado vigorosamente (con ventilación) y se permite que se separe. La capa inferior (cloroformo/aceite) fue recolectada a un matraz pre-pesado y el cloroformo nuevo fue agregado de regreso al embudo para una extracción secundaria. El cloroformo fue luego destilado
15 utilizando el dispositivo rotovap. El re-pesado del matraz proporcionó la determinación del rendimiento. El contenido de lípido fue otra vez determinado mediante HPLC, como se describe anteriormente. Mediciones analíticas de los constituyentes de carotenoide de las composiciones transesterificadas se
20 realizaron utilizando un método de HPLC, como se describe por Schmid et al, *J of Applied Phycology* 7:487-494 (1995). El análisis elemental fue efectuado mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente.

Resultados: La Tabla 7 muestra los resultados del
25 producto transesterificado de la biomasa de bajo contenido de

aceite (LO-1-8.6% de lípidos) y alto contenido de aceite (080020-1-28% de lípido). Todos los carotenoides están en mcg/g de fase lipofílica que contiene metil éteres de ácido graso.

5 **Tabla 7. Composición de biomasa de bajo contenido de aceite y alto contenido de aceite transesterificada**

	LO-I	080020-1	Especificación ASTM D6751
% de aceite de biomasa	8.6	28	
% de aceite convertido a FAME (gramo de aceite/gramo de peso de célula seca)	9.3	30.5	
<u>Elemento (ppm)</u>			
Azufre	121	52	15 ppm max
Fósforo	784	<2	0.001% masa max

15

20

25

Magnesio	2	3	Ca + Mg: 5 ppm max
Calcio	4	<2	Ca + Mg: 5 ppm max
Hierro	3	<2	
Zinc	40	12	
Sodio	190	15	Na + K: 15 ppm max
Potasio	72	<2	Na + K: 15 ppm max
Luteína (mcg/g)	469	35.5	
Zeaxantina (mcg/g)	288	23.5	
α -criptoxantina (mcg/g)	8.45	0.06	
β -criptoxantina (mcg/g)	19.2	1.80	
α -caroteno (mcg/g)	1.96	0.08	
β -caroteno (mcg/g)	15.0	1.20	

5

EJEMPLO 22**10 Cultivo de Microalgas para obtener Alto Contenido de Aceite**

Cepas de microalgas fueron cultivadas (cultivadas) para obtener un alto porcentaje de aceite en DCW. Células criopreservadas fueron desheladas a temperatura ambiente y 500 µl de células fueron agregadas a 4.5 ml del medio (4.2 g/l de K_2HPO_4 , 3.1 g/l de NaH_2PO_4 , 0.24 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g/l de ácido cítrico monohidratado, 0.025 g/l de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 g/l de extracto de levadura) más 2% de glucosa y cultivadas por 7 días a 28°C con agitación (200 rpm) en una placa de 6 cavidades. Los DCW fueron determinados al centrifugar 1 ml de cultivo a 14,000 rpm por 5 minutos en un tubo de Eppendorf pre-pesado. El sobrenadante de cultivo fue descartado y la pellet celular resultante lavada con 1 ml de agua desionizada. El cultivo fue otra vez centrifugado, el sobrenadante descartado y las pellets celulares colocadas a -80°C hasta que se congelaron. Las muestras fueron luego liofilizadas por 24 horas y los DCW

calculados. Para la determinación de lípido total en los cultivos, 3 ml de cultivo fueron removidos y sometidos a análisis utilizando un sistema de Ankom (Ankom Inc, Macedon, NY) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras
 5 fueron sometidas a extracción de solvente con un extractor Amkom XT10 de acuerdo con el protocolo del fabricante. El lípido total fue determinado como la diferencia en masa entre las muestras secadas hidrolizadas ácidas y el solvente extraído, muestras secadas. El por ciento de mediciones de DCW
 10 en aceites son mostrados en la Tabla 8.

15

Tabla 8. Cultivo de microalgas para obtener alto contenido de aceite.

	Especie	Cepa	% de aceite	Cepa # (Figuras 28 y 29a-i)
20	Chlorella kessleri	UTEX 397	39.42	4
	Chlorella kessleri	UTEX 2229	54.07	5
	Chlorella kessleri	UTEX 398	41.67	6
	Parachlorella kessleri	UTEX 11.80	37.78	7
25	Parachlorella kessleri	SAG 14.82	50.70	8
	Parachlorella kessleri	SAG 21.11 H9	37.92	9
	Prototheca stagnora	UTEX 327	13.14	10
	Prototheca moriformis	UTEX 1441	18.02	11

5

10

Chlorella luteoviridis	SAG 2203	37.88	18
Chlorella vulgaris	CCAP 211/11K	35.85	19
Chlorella reisiigii	CCAP 11/8	31.17	20
Chlorella ellipsoidea	CCAP 211/42	32.93	21
Chlorella saccharophila	CCAP 211/31	34.84	22

15

EJEMPLO 23

Genotipado de Microalgas con Alto Contenido de Aceite

Las muestras de microalgas de las 23 cepas enlistadas en la Tabla 8 anteriormente fueron genotipadas. El ADN genómico fue aislado de biomasa de algas como sigue. Las células (aproximadamente 200 mg) fueron centrifugadas de cultivos líquidos 5 minutos a 14,000 x g. Las células fueron luego resuspendidas en agua destilada estéril, centrifugadas 5 minutos a 14,000 x g y el sobrenadante descartado. Una sola

perla de vidrio de ~2 mm de diámetro fue agregada a la biomasa y los tubos fueron colocados a -80°C por al menos 15 minutos. Las muestras fueron removidas y 150 µl de solución reguladora del pH de molienda (1% de Sarkosyl, sacarosa 0.25 M, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, RNasa A 0.5 µg/ul) fue agregada. Las pelletillas fueron resuspendidas al someterlas a vórtice brevemente, seguidas por la adición de 40 µl de NaCl 5 M. las muestras fueron sometidas a vórtice brevemente, seguido por la adición de 66 µl de CTAB al 5% (bromuro de cetil trimetilamonio) y un breve vórtice final. Las muestras fueron enseguida incubadas a 65°C por 10 minutos después de lo cual fueron centrifugadas a 14,000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y extraído una vez con 300 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, seguido por centrifugación por 5 minutos a 14,000 x g. La fase acuosa resultante fue transferida a un tubo nuevo que contiene 0.7 volúmenes de isopropanol (~190 µl), mezclada mediante inversión e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos o de la noche a la mañana a 4°C. El ADN fue recuperado mediante centrifugación a 14,000 x g durante 10 minutos. La pelletilla resultante fue luego lavada dos veces con etanol al 70%, seguido por un lavado final con etanol al 100%. Las pelletillas fueron secadas por aire por 20-30 minutos a temperatura ambiente seguido por resuspensión en 50 µl de TrisCl 30 mM, EDTA 1 mM (pH 8.0).

Cinco μ l de ADN de alga total, preparado como se describe anteriormente, fueron diluidos 1:50 en Tris 10 mM, pH 8.0. Las reacciones de PCR, volumen final 20 μ l, fueron ajustadas como sigue. Diez μ l de mezcla maestra iProof HF 2 x (BIO-RAD) fueron agregados a 0.4 μ l de cebador SZ02613 (una concentración de la solución concentrada 10 mM 5'-TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC-3' (SEQ ID NO: 1)). Esta secuencia de cebador corre de la posición 567-588 en el número de acceso de GenBank L43357 y es altamente conservado en plantas superiores y genomas de plastido de algas. Esto fue seguido por la adición de 0.4 μ l de cebador SZ02615 (5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (SEQ ID NO: 2) concentración de la solución concentrada 10 mM). Esta secuencia de cebador es complementaria a la posición 1112-1093 en el número de acceso de GenBank L43357 y es altamente conservada en plantas superiores y genomas de plastido de algas. Enseguida, 5 μ l de ADN total diluidos y 3.2 μ l de dH₂O fueron agregados. Las reacciones de PCR fueron corridas como sigue: 98°C, 45", 98°C, 8", 53°C, 12", 72°C, 20" por 35 ciclos seguido por 72°C por 1 minuto y retención a 25°C. Para purificación de productos de PCR, 20 μ l de Tris 10 mM, pH 8.0, fueron agregados a cada reacción, seguido por extracción con 40 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, sometiendo a vórtice y centrifugación a 14,000 x g durante 5 minutos. Las reacciones de PCR fueron aplicadas a columnas S-400 (GE Healthcare) y centrifugadas por 2 minutos a 3,000 x g. Los

productos de PCR purificados fueron subsecuentemente clonados por TOPO a PCR8/GW/TOPO y clones positivos seleccionados para placas LB/Spec. El ADN de plásmido purificado fue secuenciado en ambas direcciones utilizando cebadores delantero e inverso

5 M13. Alineaciones de secuencia y árboles sin raíz, fueron generados utilizando elementos de programación de análisis de ADN de Geneious, son mostrados en las Figuras 29a-29i. Las secuencias de las cepas 1-23 (designadas en el Ejemplo 22, Tabla 8) son enlistadas en SEQ ID Nos: 7-29 y en el listado de

10 secuencias adjunto.

EJEMPLO 24

Diversidad de Cadenas de Lípido en Especies de Algas

Cultivos de varias especies de algas fueron

15 mantenidos, y todos los experimentos es llevaron a cabo en medio de proteasa modificado, como se describe anteriormente en el Ejemplo 2. Para cada cepa, cultivos de 10 ml fueron ajustados en matraces de 50 ml como sigue:

1. Medio de cultivo de Proteosa sin ninguna adición

20 de carbono,

2. Medio de cultivo de Proteosa con glucosa al 1%

Cada cepa fue cultivada en las dos condiciones descritas anteriormente y a una densidad de siembra inicial de 1.0×10^6 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la

25 oscuridad y agitados a 250 rpm por 7 días. Las células fueron

cosechadas después de un período de cultivo de 7 días, y determinadas por crecimiento en la oscuridad en relación con el testigo al medir el peso seco de célula. Los DCW fueron determinados como sigue. Un ml de cultivo fue centrifugado y la
 5 pelletilla resultante fue enjuagada con agua para remover cualquier sal o medio residual; la pelletilla enjuagada final fue congelada a -80°C y sometida a secado por congelación toda la noche en un sistema de secado por congelación (Labconco, MO, EUA). Todas las especies enlistadas en la Tabla 9 a
 10 continuación crecieron sobre glucosa como fuente de carbono en la oscuridad. Ninguna célula creció en ausencia de glucosa (condición 1). El perfil de glicerolípido fue determinado como se describe en el Ejemplo 20.

15

Tabla 9. Perfiles de glicerolípido de varias especies de algas

Especie	C12:0	C18:3	C14:0	C18:2	C16	C18:1	C18:0
Chlorella protothecoides	0.0%	4.0%	1.1%	24.1%	11.3%	24.9%	4.6%
Chlorella kessleri	5.6%	0.0%	4.0%	26.2%	26.6%	23.0%	4.6%
Chlorella trebouxioides	27.0%	0.0%	10.7%	0.0%	43.1%	19.3%	0.0%
Chlorella sorokiniana	34.8%	0.0%	0.0%	0.0%	46.2%	19.1%	0.0%
Prototheca kruegani	1.5%	0.0%	1.2%	12.9%	15.1%	66.0%	3.3%
Prototheca stagnora	0.8%	0.0%	0.9%	15.6%	17.1%	61.5%	4.1%

Muestras de lípido de un subconjunto de cepas cultivadas como se describe en el Ejemplo 22, y mostradas en la Tabla 8, fueron también analizadas en cuanto a perfil de lípido utilizando HPLC. Los resultados son mostrados en la Figura 29.

EJEMPLO 25

Saponificación de Biomasa de *Chlorella protothecoides* de Alto

Contenido de Aceite

Biomasa que tiene un alto contenido de aceite es generada y analizada de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 20. La biomasa comprende 45% de lípido, 20% de carbohidratos, 10% de proteína, 10% de otros constituyentes celulares, 10% de agua, y 5% de sales. En una modalidad, la biomasa puede comprender células de algas enteras secas que comprenden glóbulos de lípido suspendidos en una masa celular parcialmente deshidratada.

Preparación de un Jabón Celular Líquido: La biomasa identificada anteriormente es dispersada en agua para formar un concentrado de emulsión aceite en célula. Un exceso de KOH suficiente para convertir la cantidad deseada de glicerolípidos y ésteres de ácido graso a sales de ácidos grasos es luego disuelta en la solución acuosa que comprende la biomasa. La mezcla es luego agitada para facilitar la consumación de la

reacción de hidrólisis alcalina y calentada a una temperatura de entre 80-90°C de 30 minutos a 12 horas para completar la conversión de lípidos a sales de ácido graso. El agua perdida por la evaporación es reemplazada como sea necesario en todo el

5 proceso de reacción. Varios aditivos pueden ser combinados con la composición saponificada, en los que se incluyen glicerina (por claridad y para impartir una característica humectante), etilendiamina (EDTA, un agente quelante para mejorar el desempeño cuando se usa en condiciones de agua dura),

10 cocoamidopropil betaína (un surfactante anfotérico usado para impartir propiedades de limpieza y enjuague) y una fragancia para producir un producto de jabón. En una modalidad, el producto de jabón comprende un jabón celular con componentes como se muestra en la Tabla 10 a continuación.

15

Tabla 10. Componentes de jabón celular compuesto directamente de biomasa

20	<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
	Biomasa (células enteras)	10-60%
	KOH	1-5%
	Glicerina	5-25%
25	Fragancia	1-2%
	EDTA	1-5%
	Agua	al 100%

Los jabones celulares descritos en este ejemplo incluyen características de hidratación natural y reblandecimiento de la piel impartidas por la presencia de carbohidratos y proteínas de las células de algas, también como propiedades antioxidantes derivadas de la incorporación de carotenoides de algas y otros compuestos a la composición.

Alternativamente, una base orgánica tal como trietanolamina puede ser usada en la reacción de hidrólisis alcalina para producir un producto más claro. El uso de trietanolamina u otra fase orgánica también producirá en general un producto más suave, menos probable de provocar irritación en la piel cuando es usado como limpiador.

Opcionalmente, las sales de ácido graso pueden ser precipitadas de la mezcla mediante la adición de sales de NaCl o KCl y separadas para uso en composiciones en combinación con varios aditivos como se describe en la presente.

La Figura 20 muestra una micrográfica de jabón fabricado con biomasa de *Chlorella protothecoides* de DECISIÓN de 48% de aceite. El jabón contenía 10% en peso/peso de biomasa de algas.

Saponificación de Aceite Extraído de Hexano de Biomasa de
Chlorella protothecoides

La biomasa es generada de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 20. Se efectúa la extracción de hexano convencional de los lípidos de la biomasa. Los lípidos extraídos por hexano son luego saponificados al mezclar los lípidos con una solución acuosa de NaOH o KOH que contiene una cantidad de base suficiente para convertir la cantidad deseada de lípido a sales de ácido graso y opcionalmente calentamiento de la mezcla para acelerar la reacción. Las sales de ácido graso son luego precipitadas mediante la adición de NaCl o KCl. Composiciones de aceites saponificados derivados de biomasa extraída de hexano que contiene proporciones más altas de carotenoides contaminantes debido a la eficiencia con la cual el hexano extrae tales compuestos de la biomasa microbiana.

EJEMPLO 27

Saponificación de Aceite Extraído Sin Solvente de Biomasa de
Chlorella protothecoides

La biomasa es generada de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 20. Una extracción sin solventes de los lípidos de biomasa es efectuada mediante lisis y prensado de la biomasa por medio del uso de presión física. Los lípidos extraídos son luego saponificados al mezclar los lípidos con una solución acuosa de NaOH o KOH que contiene una cantidad de

Perfil de Glicerolípido de Cepas de Prototheca

Cinco cepas de *Prototheca* fueron cultivadas en medio con 2% de glucosa y cultivadas durante 7 días a 28°C con agitación (200 rpm) en una placa de 6 cavidades. Los perfiles de lípido fueron determinados utilizando métodos de HPLC estándar. El perfil de lípidos para una cepa particular no cambió significativamente cuando es cultivada en medios de cultivo diferentes. Los resultados son mostrados en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11. Perfil de Glicerolípido de Cepas de Prototheca

25	Origen	Especie	C:12:0	C:13:0	C:14:0	C:16:0	C16:1	C:18:0	C:18:1	C:18:2	C:18:3
	UTEX 327	Prototheca stagnora	0%	0%	0%	15%	0%	0%	63%	22%	0%

5

10

15 La biomasa de UTEX 1435 fue sometida a extracción de
hexano. El aceite extraído contenía muy poca coloración. La
Figura 19 muestra una muestra del aceite UTEX 1435 en
comparación con el aceite de UTEX 250 de *Chlorella*
protothecoides.

20

EJEMPLO 29

Análisis de Carotenoide y Clorofila de Aceite Extraído de UTEX 1435 de *Prototheca moriformis*

25 El aceite extraído por hexano de biomasa de
Prototheca moriformis (UTEX 1435) fue generado de acuerdo con

los métodos descritos en el Ejemplo 26 anterior fue analizado en cuando a carotenoides y clorofila utilizando HPLC. En general, los niveles de carotenoide fueron mucho más bajos que los niveles de carotenoide en aceite descritos en la Tabla 7 anterior. Adicionalmente, el contenido de clorofila del aceite fue menos de 0.01 mg/kg. Este resultado es consistente con los resultados mostrados en la Figura 19, con el aceite extraído de la biomasa de UTEX 1435 que tiene muy poca coloración. El análisis de carotenoide y clorofila para el aceite extraído de la biomasa de UTEX 1435 es resumido en la Tabla 12 a continuación.

15

Tabla 12. Análisis de carotenoide de aceite extraído de UTEX 1435 de *Prototheca moriformis*.

20	Luteína	0.382 mcg/g
	Zeaxantina	1.23 mcg/g
	Cis-Luteína/Zeaxantina	0.446 mcg/g
	Alfa-criootpxantina	Ninguno detectado
	Beta-criptoxantina	Ninguno detectado
25	Licopeno	Ninguno detectado
	Alfa-caroteno	0.057 mcg/g
	Cis-beta-caroteno	0.127 mcg/g

5

10 **EJEMPLO 30****Análisis de ADN Genómico de rARN 23S de 8 cepas *Chlorella protothecoides***

El ADN genómico de 8 cepas de *Chlorella protothecoides* (UTEX 25, UTEX 249, UTEX 250, UTEX 256, UTEX
 15 264, UTEX 411, CCAP 211/17 y CCAP 211/8d) fue aislado y el análisis de ADN genómico de rARN 23S fue efectuado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 23 anterior.

Todas las cepas de *Chlorella protothecoides* probadas fueron idénticas en secuencia excepto por UTEX 25. Los
 20 resultados son resumidos en el Cladograma mostrado en las Figuras 21a-21c. Las secuencias para todas las ocho cepas son enlistadas en SEQ ID Nos: 3-4n en el listado de secuencias adjunto.

La secuencia genómica de rARN 23s para *Prototheca*
 25 *moriformis* UTEX 1436 (SEQ ID NO: 5) fue también comparada con

otras especies de *Prototheca* especie y *Chlorella protothecoides*. La comparación demostró que la secuencia genómica de rARN 23s para UTEX 1436 de *Prototheca moriformis* fue disimilar a los otros genotipos de *Prototheca* (SEQ ID NO: 5 6).

EJEMPLO 31

Selección de Utilización de Sorgo

Cepas: Las siguientes cepas fueron usadas en la
10 selección para identificar cepas de microalgas aptas de
utilizar sorgo como única fuente de carbono: las 10 cepas
fueron *Chlorella protothecoides* (UTEX 25, UTEX 31, UTEX 411,
CCAP 221/8D, UTEX 249, UTEX 250, UTEX 256, UTEX 264, SAG 211-
10D, y CCAP 211/17) 6 cepas fueron *Prototheca moriformis* (UTEX
15 1435, UTEX 1437, UTEX 288, UTEX 1439, UTEX 1441 y UTEX 1434).
Otras cepas incluyeron *Chlorella luteoviridis* (UTEX 22 y SAG
2214), *Chlorella kessleri* (UTEX 2229), *Parachlorella kessleri*
(SAG 12.80) y *Prototheca stagnora* (UTEX 1442).

Condiciones de cultivo: Cultivos de siembra de la
20 cepa de microalgas (identificadas anteriormente) fueron
iniciadas como 1 ml de cultivos líquidos en placas de 24
cavidades y fueron cultivadas autotróficamente por 48 horas en
la luz, agitando a ~350 rpm. El sorgo puro fue comprado de
Maasdam Sorghum Mills (Lynnvile, Iowa) con un perfil de azúcar
25 de fructosa 21.0% en peso/peso, dextrosa 28.0% en peso/peso,

sacarosa 16.0% en peso/peso y maltosa <0.5% en peso/peso. Los cultivos fueron luego transferidos a un medio líquido que tiene 2%, 5% o 7% (volumen/volumen) de sorgo puro (diluido de la solución concentrada pura) como la única fuente de carbono y los cultivos fueron luego cultivos heterotróficamente en la oscuridad, agitando a ~350 rpm. Las muestras de los cultivos fueron jaladas a 24, 40, 48, 67 y 89 horas y el cultivo fue medido utilizando lecturas de A750 sobre un espectrofotómetro. El crecimiento fue observado para cada una de las cepas probadas, como se muestra en las Figuras 22-27.

REIVINDICACIONES

1. Un método para modificar químicamente lípidos de microalgas que comprende:

- 5 (a) cultivar una población de microalgas del género *Prototheca* o del género *Chlorella* bajo condiciones heterotróficas para producir biomasa que comprende de lípido de microalgas y no mas 500 ppm de impurezas que generan color, en donde las impurezas que generan color
- 10 son carotenoides y/o clorofila; y;
- (b) someter el lípido a una reacción química que modifica covalentemente el lípido, donde la reacción química comprende transesterificación, interesterificación, hidroxilación, ciclopropanación, epoxidación,
- 15 hidroprocesamiento, desoxigenación, isomerización, hidrogenación, saponificación o hidrólisis.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido de microalgas se extrae de la biomasa antes de ser sometido a

20 la reacción química.

3. El método de la reivindicación 1, en donde el lípido de microalgas se somete a la reacción química en la biomasa.

25 4. El método de la reivindicación 3, en donde las

células de la biomasa son lisadas antes de someter el lípido de microalgas a la reacción química.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1
5 a 4, en donde las microalgas son unas especies seleccionadas del grupo que consiste de *Prototheca Stagnora*, *Prototheca Portoricensis*, *Prototheca Moriformis* y *Prototheca Zopfii*.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1
10 a 4, en donde las microalgas son unas especies seleccionadas del grupo que consiste de *Chlorella fusca*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella ellipsoidea*.

15

7. Un método para fabricar jabón, que comprende:

(a) proporcionar lípido de microalga que comprende no más de 500 ppm de impurezas que generan color, en donde el lípido de microalgas se obtiene de microalgas del género *Prototheca* o
20 del género *Chlorella*, y las impurezas que generan color son carotenoides y/o clorofila; y

(b) saponificar el lípido de microalgas para producir un jabón.

25 8. Un método para hacer un jabón, que

comprende saponificar la biomasa de microalga que comprende lípido de microalga y no más de 500 ppm de impurezas que generan color, en donde la biomasa de microalgas comprende células del género *Prototheca* o del género *Chlorella* y las impurezas que generan color son carotenoides y/o clorofila, y en donde la saponificación se efectúa al poner en contacto la biomasa de microalga con una solución acuosa que contiene una base para formar sales de ácidos graso, donde el jabón comprende sales de ácido graso.

9. El método de la reivindicación 7 o reivindicación 8, en donde las microalgas son especies seleccionadas del grupo que consiste de *Prototheca Wickerhamii*, *Prototheca Stagnora*, *Prototheca Portoricensis*, *Prototheca Moriformis* y *Prototheca Zopfii*.

10. El método de la reivindicación 7 o reivindicación 8, en donde las microalgas son especies seleccionadas del grupo que consiste de *Chlorella Fusca*, *Chlorella Protothecoides*, *Chlorella Pyrenoidosa*, *Chlorella Kessleri*, *Chlorella Vulgaris*, *Chlorella Saccharophila*, *Chlorella Sorokiniana* y *Chlorella Ellipsoidea*.

11. Una composición que comprende sales de ácidos

grasos de lípido de microalga saponificado que comprende no más de 500 ppm de impurezas que generan color, en donde las impurezas que generan color son carotenoides y/o clorofila.

5 12. La composición de la reivindicación 11 que comprende biomasa de células de microalga, además del lípido de microalga saponificado.

13. La composición de la reivindicación 12, donde la
10 biomasa de célula de microalga comprende menos de 0,01 mg / kg de clorofila.

14. La composición de la reivindicación 12 o reivindicación 13, en donde la biomasa de célula de microalga
15 comprende células de microalga del género *Prototheca* o del género *Chlorella*.

15. La composición de la reivindicación 14, en donde las células de microalga son unas especies seleccionadas del grupo
20 que consiste de *Prototheca Wickerhamii*, *Prototheca Stagnora*, *Prototheca Portoricensis*, *Prototheca Moriformis* y *Prototheca Zopfii*.

16. La composición de la reivindicación 14, en donde las
25 células de microalga son unas especies seleccionadas del grupo

que consiste de *Chlorella Fusca*, *Chlorella Protothecoides*, *Chlorella Pyrenoidosa*, *Chlorella Kessleri*, *Chlorella Vulgaris*, *Chlorella Saccharophila*, *Chlorella Sorokiniana* y *Chlorella Ellipsoidea*.

5

17. La composición de la reivindicación 11 que además comprende sales de ácidos grasos de al menos un aceite saponificado seleccionado del grupo que consiste de aceite de palma, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de cacao, grasa de pollo, sebo de res, sebo porcino, aceite de soja, aceite de colza, aceite de canola, aceite de palmiste, aceite de maíz, aceite vegetal de desperdicio, cebo chino, aceite de girasol, aceite de semilla de algodón, aceite de microalgas, aceite de macroalgas, aceite de Cuphea, aceite de lino, aceite de maní, grasa blanca de calidad, manteca de cerdo, aceite de *Camelina sativa*, aceite de semilla de mostaza, aceite de marañón, aceite de avena, aceite de lupino, aceite de kenaf, aceite de caléndula, aceite de cáñamo, aceite de café, aceite de semillas de lino (lino), aceite de avellana, aceite de euphorbia, aceite de semilla de calabaza, aceite de cilantro, aceite de camelia, aceite de ajonjolí, aceite de cártamo, aceite de arroz, aceite de árbol de tung, aceite de copra, aceite de adormidera, aceite de semillas de ricino, aceite de pecana, aceite de jojoba, aceite de jatropha, aceite de macadamia, aceite de nueces del Brasil, aceite de aguacate, y aceite de

25

fósil o una fracción destilada del mismo.

5

10

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen jabón y productos cosméticos que pueden ser fabricados a partir de biomasa microbiana portadora de aceite vía la hidrólisis alcalina de glicerolípidos y ésteres de ácido graso a sales de ácido graso. Los aceites saponificados pueden ser combinados con una variedad de aditivos para producir composiciones para uso como productos cosméticos, que pueden también contener otros constituyentes de la biomasa, en los que se incluyen aceites sin saponificar, glicerol y carotenoides entre otros.