Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de Pro
División de Nuev

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-134253- -00000-0000
Fecha: 2010-10-28 18:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 806

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-134253

54. **TÍTULO** MODIFICACION QUIMICA DIRECTA DE BIOMASA MICROBIANA Y ACEITES MICROBIANOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** SOLAZYME, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS

74. **APODERADO** ALVARO CORREA ORDOÑEZ

22. **BOGOTÁ, D.C.,** Octubre 28, 2010.

(FORMA P-10)
Titulo, Poder
04-11-2010

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-134253- -00000-0000
Fecha: 2010-10-28 18:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios~~306~~ 306

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE :

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

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: **SOLAZYME, INC.**

Dirección: 2251 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono: Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C. [ ] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500 Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakermckenzie.com

IDENTIFICACION

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número 79.143.366 Usaquén TP 20281

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: DAY, Anthony, G., DILLON, Harrison, Fields, BROOKS, Geoffrey, FRANKLIN, Scott

Dirección: 225 Gateway Boulevard South San Francisco, CA 94080 (US); 225 Gateway Boulevard South San Francisco, CA 94080 (US); 225 Gateway Boulevard South San Francisco, CA 94080 (US); 225 Gateway Boulevard South San Francisco, CA 94080 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

(5) PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/040123 Fecha 09-04-2009

Publicación Internacional No. WO/2009/126843 Fecha 15-10-2009

(6) Título (54) MODIFICACIÓN QUÍMICA DIRECTA DE BIOMASA MICROBIANA Y ACEITES MICROBIANOS (Folio 311)

(7) Clasificación Internacional (51) C12P 7/64 , C12P 1/04

(8) Prioridad

SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	09-04-2008	60/043,620
US	20-06-2008	61/074,610

(9) Comprobante de pago No. 10-82,206 – 10-86,643 – 10-86,368 **Fecha** Octubre 28, 2010

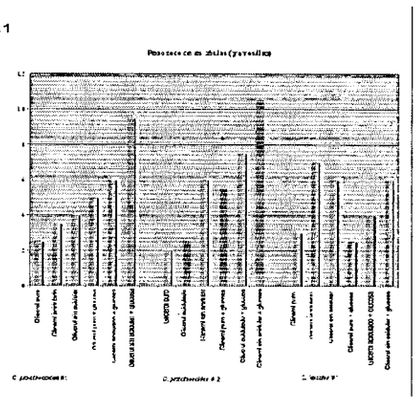
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) ANEXOS

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

(11) FIGURA CARATERISTICA

Figura 1



(12) Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

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

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

2010/019

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 82,206
FECHA : SEPTIEMBRE 30 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-134253- -00000-0000
Fecha: 2010-10-28 18:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 806

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	139003675	30/09/2010	79,775,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
			TOTAL : $	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2010/020

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 86,643
FECHA : OCTUBRE 13 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-134253- -00000-0000
Fecha: 2010-10-28 18:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 806

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353168045	12/10/2010	94,250,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21	CERTIFICACIONES	13,000.00
			TOTAL : $	13,000.00

SON: TRECE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2010/020

5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176087-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-134253- -00000-0000

Fecha: 2010-10-28 18:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 806

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 86,368
FECHA : OCTUBRE 13 DE 2010

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353168045	12/10/2010	94,250,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES		819,000.00
		TOTAL :	$	819,000.00

SON: OCHOCIENTOS DIEZ Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

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

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

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

(51) Clasificación Internacional: C12P 7/64 , C12P 1/04

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

(72) Inventor(es): DAY, Anthony, G., DILLON, Harrison, Fields, BROOKS, Geoffrey, FRANKLIN, Scott

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	32) *Fecha*	(33) *País*
	60/043,620	09-04-2008	US
	61/074,610	20-06-2008	US

(85) Fecha inicio fase nacional: 09-11-2010

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 09-04-2009
No. de solicitud: PCT/US2009/040123

(87) Publicación internacional
Fecha: 15-10-2009
N° publicación: WO 2009/126843

(54) Titulo: MODIFICACIÓN QUÍMICA DIRECTA DE BIOMASA MICROBIANA Y ACEITES MICROBIANOS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

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

PATENTE DE INVENCION ____ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ___

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

(51) Clasificación Internacional: C12P 7/64 , C12P 1/04

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

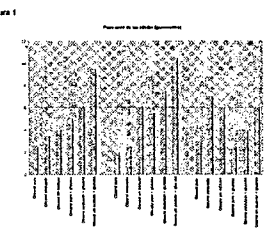
(72) Inventor(es): DAY, Anthony, G., DILLON, Harrison, Fields, BROOKS, Geoffrey, FRANKLIN, Scott

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	32) *Fecha*	(33) *País*
	60/043,620	09-04-2008	US
	61/074,610	20-06-2008	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 09-11-2010
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 09-04-2009
No. de solicitud: PCT/US2009/040123

(87) Publicación internacional:
Fecha: 15-10-2009
No. Publicación: WO 2009/126843



(54) Titulo: MODIFICACIÓN QUÍMICA DIRECTA DE BIOMASA MICROBIANA Y ACEITES MICROBIANOS

(57) Resumen: 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.

CONTINUA AL RESPALDO ...

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

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

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: C12P 7/64 , C12P 1/04
22) Fecha de solicitud:	(71)Solicitante(s) **SOLAZYME, INC.**
(30) Prioridad (31) ***No.*** 32) ***Fecha*** (33) ***País*** 60/043,620 09-04-2008 US 61/074,610 20-06-2008 US	(72) Inventor(es) DAY, Anthony, G., DILLON, Harrison, Fields, BROOKS, Geoffrey, FRANKLIN, Scott
	(74) Apoderado: **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 09-11-2010 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 09-04-2009 No. de PCT/US2009/040123	(87) Publicación internacional Fecha: 15-10-2009 N° publicación: WO 2009/126843
(54) Titulo: MODIFICACIÓN QUÍMICA DIRECTA DE BIOMASA MICROBIANA Y ACEITES MICROBIANOS	

Reivindicación(es): 1. Un método para modificar químicamente biomasa microbiana que contiene lípidos, caracterizado porque comprende:

(a) cultivar una población de microbios;

(b) cosechar la biomasa microbiana, en donde la biomasa contiene por lo menos 5% en peso seco de célula de lípido; y

(c) someter la biomasa a una reacción química que modifica covalentemente por lo menos 1% del lípido.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

TERMES, Lance, A.
Townsend And Townsend And Crew LLP
Two Embarcadero Center, 8th Floor
San Francisco, CA 94111-3834
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
21 June 2010 (21.06.2010)

Applicant's or agent's file reference
26172-28-3PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2009/040123

International filing date *(day/month/year)*
09 April 2009 (09.04.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
SOLAZYME, INC.
[redacted] Eccles Avenue
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.: 650-780-4777
Facsimile No.: 650-989-6700
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
SOLAZYME, INC.
225 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.: 650-780-4777
Facsimile No.: 650-989-6700
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Marquis Catherine
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

TERMES, Lance, A.
Townsend And Townsend And Crew LLP
Two Embarcadero Center, 8th Floor
San Francisco, CA 94111-3834
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
21 June 2010 (21.06.2010)

Applicant's or agent's file reference
26172-28-3PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2009/040123

International filing date *(day/month/year)*
09 April 2009 (09.04.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
DAY, Anthony, G.
561 Eccles Avenue
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
DAY, Anthony, G.
225 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Marquis Catherine
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

TERMES, Lance, A.
Townsend And Townsend And Crew LLP
Two Embarcadero Center, 8th Floor
San Francisco, CA 94111-3834
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 21 June 2010 (21.06.2010)	
Applicant's or agent's file reference 26172-28-3PC	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US2009/040123	International filing date *(day/month/year)* 09 April 2009 (09.04.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

DILLON, Harrison, Fields
561 Eccles Avenue
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality	State of Residence
US	US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

DILLON, Harrison, Fields
225 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality	State of Residence
US	US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 87 20	Authorized officer Marquis Catherine e-mail pt03.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

TERMES, Lance, A.
Townsend And Townsend And Crew LLP
Two Embarcadero Center, 8th Floor
San Francisco, CA 94111-3834
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
21 June 2010 (21.06.2010)

Applicant's or agent's file reference
26172-28-3PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2009/040123

International filing date *(day/month/year)*
09 April 2009 (09.04.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
BROOKS, Geoffrey
561 Eccles Avenue
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality	State of Residence
US	US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
BROOKS, Geoffrey
225 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality	State of Residence
US	US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Marquis Catherine
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

Form PCT/IB/306 (January 2009)

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

TERMES, Lance, A.
Townsend And Townsend And Crew LLP
Two Embarcadero Center, 8th Floor
San Francisco, CA 94111-3834
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
21 June 2010 (21.06.2010)

Applicant's or agent's file reference
26172-28-3PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2009/040123

International filing date *(day/month/year)*
09 April 2009 (09.04.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
FRANKLIN, Scott
561 Eccles Avenue
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality	State of Residence
US	US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
FRANKLIN, Scott
225 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080
United States of America

State of Nationality	State of Residence
US	US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Marquis Catherine
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
15 October 2009 (15.10.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/126843 A2

(51) International Patent Classification:
C12P 7/64 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/040123

(22) International Filing Date:
9 April 2009 (09.04.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/043,620 9 April 2008 (09.04.2008) US
61/074,610 20 June 2008 (20.06.2008) US

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

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **DAY, Anthony, G.** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US). **DILLON, Harrison, Fields** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US). **BROOKS, Geoffrey** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US). **FRANKLIN, Scott** [US/US]; 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US).

(74) Agents: **TERMES, Lance, A.** et al.; Townsend And Townsend And Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111-3834 (US).

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

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

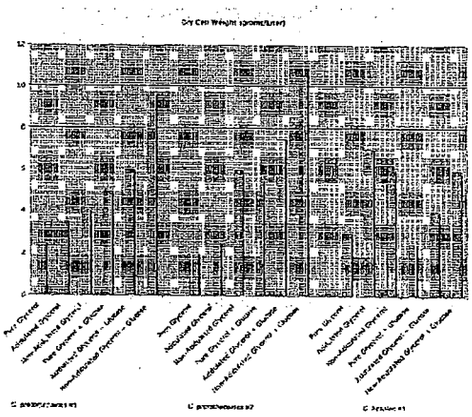
Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: DIRECT CHEMICAL MODIFICATION OF MICROBIAL BIOMASS AND MICROBIAL OILS

Figure 1



(57) Abstract: Soap and cosmetic products can be made from oil-bearing microbial biomass via the alkaline hydrolysis of glycerolipids and fatty acid esters to fatty acid salts. The saponified oils can be combined with a variety of additives to produce compositions for use as cosmetic products, which may also contain other constituents of the biomass, including unsaponified oils, glycerol and carotenoids, among others.

WO 2009/126843 A2

DIRECT CHEMICAL MODIFICATION OF MICROBIAL BIOMASS AND MICROBIAL OILS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] The present application is a nonprovisional and claims the benefit of 61/043,620, filed April 9, 2008 and 61/074610 filed June 20, 2008 incorporated by reference in their entirety for all purposes.

REFERENCE TO A SEQUENCE LISTING

[0002] This application includes a sequence listing as shown in pages 1-12, appended hereto.

FIELD OF THE INVENTION

[0003] The invention resides in the fields of genetic engineering, aquaculture, and the chemical modification of lipid-containing microbial biomass.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] Increased demand for energy by the global economy has placed increasing pressure on the cost of fossil fuels. This, along with increasing interest in reducing air pollution, has spurred the development of domestic energy supplies and triggered the development of non-petroleum fuels for internal combustion engines. For compression ignition (diesel) engines, it has been shown that the simple alcohol esters of fatty acids (biodiesel) are acceptable as an alternative diesel fuel. Biodiesel has a higher oxygen content than diesel derived from fossil fuels, and therefore reduces emissions of particulate matter, hydrocarbons, and carbon monoxide, while also reducing sulfur emissions due to a low sulfur content (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. *Sci.*, 24:125-164 (1998)).

[0005] Initial efforts at the production, testing, and use of biodiesel employed refined edible vegetable oils (expelled or recovered by solvent extraction of oilseeds) and animal fats (*e.g.*, beef tallow) as feedstocks for fuel synthesis (*see, e.g.*, Krawczyk, T., INFORM, 7: 800-815 (1996); and Peterson, C. L., *et al.*, *Applied Engineering in Agriculture*, 13: 71-79 (1997). Further refinement of the methods has enabled production of fatty acid methyl esters (FAME) from cheaper, less highly refined lipid feedstocks such as spent restaurant grease and soybean soapstock (*see, e.g.*, Mittelbach, M., and P. Tritthart, *J. Am Oil Chem. Soc.*, 65(7):1185-1187 (1988); Graboski, M. S., *et al.*, The Effect of Biodiesel Composition on Engine Emissions

from a DDC Series 60 Diesel Engine, Final Report to USDOE/National Renewable Energy Laboratory, Contract No. ACG-8-17106-02 (2000).

[0006] For decades, photoautotrophic growth of algae has been proposed as an attractive method of manufacturing biodiesel from algae; see A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann and Paul Roessler (1998). Many researchers believe that because sunlight is a "free" resource, photoautotrophic growth of algae is the most desirable method of culturing microalgae as a feedstock for biofuel production (see, for example Chisti, Biotechnol Adv. 2007 May-Jun;25(3):294-306: "heterotrophic production is not as efficient as using photosynthetic microalgae . . . because the renewable organic carbon sources required for growing heterotrophic microorganisms are produced ultimately by photosynthesis, usually in crop plants"). Other research has not only assumed that photoautotrophic growth is the best way to grow microalgae for biofuels, but also that there is no need to transesterify any material from microalgal biomass before introduction into a diesel engine (see Screagg et al., Enzyme and Microbial Technology, Vol. 33:7, 2003, Pages 884-889).

[0007] Photosynthetic growth methods have been the focus of considerable research over the past several decades, spurred in part by the U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development, which funded a program to develop renewable transportation fuels from algae during the period spanning 1978 to 1996. The principal production design was centered around a series of shallow outdoor sunlight-driven ponds designed as "raceways" in which algae, water and nutrients were circulated around a circular pond in proximity to a source of waste CO_2 (*e.g.*, a fossil fuel powered electricity generating plant).

[0008] Transesterification of extracted/refined plant oils is conventionally performed by reacting a triacylglycerol ("TAG") with a lower-alkyl alcohol (*e.g.*, methanol) in the presence of a catalyst (*e.g.*, a strong acid or strong base) to yield fatty acid alkyl esters (*e.g.*, fatty acid methyl esters or "FAME") and glycerol.

[0009] As described above, traditional biodiesel production has relied on extracted and/or refined oils (expelled or recovered by solvent extraction of oilseeds) as a feedstock for the transesterification process. Oil sources, including soy, palm, coconut, and canola, are commonly used, and extraction is performed by drying the plant material and pretreating the material (*e.g.*, by flaking) to facilitate penetration of the plant structure by a solvent, such as

hexane. Extraction of these oils for use as a starting material contributes significantly to the cost of traditional biodiesel production.

[0010] Similar to the solvent extraction processes utilized to extract oils from dried plant materials, solvent extraction of oils from microbial biomass is carried out in the presence of an organic solvent. Solvent extraction in this context requires the use of a solvent that is essentially immiscible in water, such as hexane, to produce a solvent phase, in which the oil is soluble, and an aqueous phase, which retains the largely non-lipid portion of the biomass. Unfortunately, in an industrial scale production, the volume of volatile, potentially carcinogenic, and flammable organic solvent that must be used for efficient extraction creates hazardous operating conditions having both environmental and worker safety aspects. Moreover, the solvent extraction process generates a substantial solvent waste stream that requires proper disposal, thereby increasing overall production costs.

[0011] Alternatively, "solventless" extraction processes have been reported; these employ an aqueous solvent comprising no more than about 5% organic solvent for extracting lipids from microorganisms for use as a feedstock in a transesterification process for the production of biodiesel. Briefly, the "solventless" extraction process includes contacting a lysed cell mixture with an aqueous solvent containing no more than about 5% organic solvent (*e.g.*, hexane) to produce a phase separated mixture. The mixture comprises a heavier aqueous layer and a lighter layer comprising emulsified lipids. The extraction process is repeatedly performed on the lighter lipid layer until a non-emulsified lipid layer is obtained. Unfortunately, the repeated isolation and washing of the lipid layer makes the "solventless" process particularly laborious.

[0012] There remains a need for cheaper, more efficient methods for extracting valuable biomolecules derived from lipids produced by microorganisms. The present invention meets this need.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0013] In a first aspect, the present invention relates to the discovery that direct chemical modification of lipid-containing microbial biomass can dramatically increase the efficiency and decrease the cost of obtaining valuable materials derived from those lipids. Thus, in a first embodiment, then invention provides a method of chemically modifying lipid-containing microbial biomass including the steps of culturing a population of microbes, harvesting microbial biomass that contains at least 5% lipid by dry cell weight (DCW), and subjecting the biomass to a chemical reaction that covalently modifies at least 1% of the lipid. In some

embodiments, the method further includes separating the covalently modified lipid from other components of the biomass.

[0014] In various embodiments, the ratio of the covalently modified lipid to the biomass from which it is separated is between 10% lipid and 90% biomass and 90% biomass and 10% lipid by dry weight. In some embodiments, the step of separating the lipid from other components of the biomass includes a phase separation step in which the covalently modified lipids form a lighter non-aqueous phase and components of the biomass form one or more heavier phases. In some embodiments, the biomass is subjected to the chemical reaction without a step of prior enrichment that increases the ratio of the lipids to the non-lipid material by more than 50% by weight. In other embodiments, the biomass is subjected to the chemical reaction with a step of prior enrichment that increases the ratio of the lipids to the dry weight of the microbes. In some embodiments, the harvested biomass is not subjected to any treatment other than the removal of water and/or lysis of the cells before the chemical reaction. In some embodiments, the biomass subjected to the chemical reaction contains components other than water in the same relative proportions as the cell culture. In some embodiments, the lipid content of the biomass is less than 90% of the biomass subjected to the chemical reaction.

[0015] In one embodiment, chemical modification of the lipid-containing microbial biomass comprises transesterifying the biomass to generate a lipophilic phase containing fatty acid alkyl esters and a hydrophilic phase containing cell material and glycerol. In some embodiments, the method further comprises removing water from the biomass prior to subjecting the biomass to the transesterifying chemical reaction. In other embodiments, the method further comprises removing water from the biomass after the disrupting of the biomass. In some embodiments, removing water from the biomass is performed using a method selected from the group consisting of lyophilization, drum drying, and oven drying the biomass.

[0016] In some embodiments, in which the chemical modification of the lipid-containing microbial biomass comprises transesterifying the biomass, the method further comprises disrupting the biomass prior to transesterifying the biomass. In some embodiments, water is removed from the biomass prior to the disrupting of the biomass. In some embodiments, disrupting the biomass comprises heating the biomass to generate a lysate. In other embodiments, disrupting the biomass comprises contacting the biomass with an acid or base sufficient to generate a lysate. In still other embodiments, disrupting the biomass comprises

contacting the biomass with one or more enzymes to generate a lysate. In some embodiments, the biomass is contacted with at least one protease and at least one polysaccharide-degrading enzyme. In some embodiments, disrupting the biomass comprises mechanically lysing the population of microbes to generate a lysate. In other embodiments, disrupting the biomass comprises subjecting the biomass to osmotic shock to generate a lysate. In still other embodiments, disrupting the biomass comprises infecting the population of microbes with a lytic virus to generate a lysate. In other embodiments, disrupting the biomass comprises inducing the expression of a lytic gene within the population of microbes to promote autolysis and generation of a lysate.

[0017] In some embodiments of the chemical modification method in which the chemical reaction comprises transesterification, the fatty acid alkyl esters are fatty acid methyl esters or fatty acid ethyl esters. In some embodiments, transesterifying the biomass comprises contacting the biomass with an alcohol and a base. In some embodiments, the alcohol is selected from methanol, ethanol, propanol, isopropanol, and mixtures thereof. In some embodiments, the base is selected from NaOH, KOH, and mixtures thereof. In one embodiment, the alcohol is methanol and the base is NaOH. In some embodiments, transesterifying the biomass comprises contacting the biomass with an alcohol and a lipase. In some embodiments, the lipase is expressed from an exogenous lipase gene within the population of microbes. In some embodiments, expression of the exogenous lipase gene is induced by contacting the biomass with a stimulus to activate an inducible promoter controlling expression of the exogenous lipase gene.

[0018] In various embodiments, the amount of calcium and magnesium, combined, by weight in the lipophilic phase is no greater than 5 parts per million. In some embodiments, the amount of phosphorous in the lipophilic phase is no greater than 0.001%, by mass. In some embodiments, the amount of sulfur in the lipophilic phase is no greater than 15 parts per million. In some embodiments, the amount of potassium and sodium, combined, by weight in the lipophilic phase is no greater than 5 parts per million. In some embodiments, the total carotenoid content of the lipophilic phase is no greater than 100 micrograms of carotenoid per gram. In some embodiments, the total chlorophyll content in the lipophilic phase is no greater than 0.1 mg/kg.

[0019] In some embodiments, subjecting the biomass to a chemical reaction includes contacting the biomass with an enzyme to catalyze the chemical reaction. In some embodiments, the enzyme is a lipase. In one embodiment, the method further comprises

separating a lipophilic phase containing the covalently modified lipids from hydrophilic cell material of the biomass.

[0020] In various embodiments of the present invention, the microbes and the resulting microbial biomass are selected from the group consisting of bacteria, cyanobacteria, eukaryotic microalgae, oleaginous yeast, and fungi. In some embodiments, the microbes are selected from the group consisting of the eukaryotic microalgae listed in Table 1. In some embodiments, the microbes are a species of the genus *Chlorella*, and in various embodiments, the species is selected from the group consisting of *Chlorella fusca, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, Chlorella kessleri, Chlorella vulgaris, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana* and *Chlorella ellipsoidea*. In one embodiment, the species is *Chlorella protothecoides*. In some embodiments, the microbes is a species of the genus *Prototheca*, or the species is selected from the group consisting of *Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis,* and *Prototheca zopfii*. In some embodiments, the microbes are selected from the group consisting of the oleaginous yeast listed in Table 2, and in other embodiments, the microbes are selected from the group consisting of the fungi listed in Table 3. In some embodiments, the microbial biomass comprises a mixture of biomass from two distinct strains or species of microbes that have been separately cultured. In one embodiment, at least two of the distinct strains or species of microbes have different glycerolipid profiles. In some embodiments, the species has a high degree of taxonomic similarity to members of the *Chlorella* or *Prototheca* genera, such as at least 95% nucleotide identity at the 23S rRNA level, as disclosed in the examples.

[0021] In various embodiments of the present invention, the harvested biomass comprises a lipid content of at least 5%, at least 10%, at least 15%, at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, or at least 90% by DCW. In some embodiments, at least 20% of the lipid is C18. In some embodiments, at least 30% of the lipid is C18. In some embodiments, at least 40% of the lipid is C18. In some embodiments, at least 50% of the lipid is C18. In some embodiments, at least 50% of the lipid is C16 or longer chain lengths. In some embodiments, at least 10% of the lipid is C14 or shorter chain lengths. In some embodiments, at least 20% of the lipid is C14 or shorter chain lengths.

[0022] In some embodiments of the present invention, the population of microbes expresses an exogenous sucrose utilization gene. In some embodiments, the gene is a sucrose invertase. In some embodiments, the population of microbes expresses an exogenous lipid

pathway enzyme. In some embodiments, the lipid pathway enzyme comprises an acyl-ACP thioesterase. In some embodiments, the population of microbes further expresses an exogenous "naturally co-expressed" acyl carrier protein that is co-expressed with the acyl-ACP thioesterase. In some embodiments, the lipid pathway enzyme has a specificity for acting on a substrate having a specified number of carbon atoms in a chain.

[0023] In some embodiments, chemical modification of the lipid-containing microbial biomass comprises hydrogenating the biomass to saturate at least a subset of unsaturated bonds in the lipid. In some embodiments, chemical modification of the lipid-containing microbial biomass comprises interesterifying the biomass to generate a mixture of glycerolipids having a modified arrangement of fatty acid constituents relative to the glycerolipids in the harvested biomass. In some embodiments, chemical modification of the lipid-containing microbial biomass comprises hydroxylating the biomass to generate hydroxylated lipids. In some embodiments, at least a portion of the hydroxylated lipids are esterified to generate estolides. In some embodiments, chemical modification of the lipid-containing microbial biomass comprises hydrolyzing the biomass to generate free fatty acids from the lipid. In some embodiments, the free fatty acids are subjected to further chemical modification. In one embodiment, chemical modification of the lipid-containing microbial biomass comprises deoxygenation at elevated temperature in the presence of hydrogen and a catalyst, isomerization in the presence of hydrogen and a catalyst, and removal of gases and naphtha compounds.

[0024] In another embodiment, chemical modification of the lipid-containing microbial biomass comprises saponifying the biomass to generate fatty acid salts from the lipid. In one embodiment, the biomass is derived from a microalgae of the genus *Prototheca*. In some embodiments, saponifying the biomass comprises contacting the biomass with a base sufficient to convert at least a portion of the glycerolipid and/or fatty acid ester components of the lipid to fatty acid salts. In some embodiments, the base is an alkali metal hydroxide, such as NaOH or KOH. In some embodiments, the method further comprises contacting the biomass with a salt to precipitate the fatty acid salts from solution. In some embodiments, the salt comprises a water-soluble alkali metal halide, such as NaCl or KCl.

[0025] In some embodiments, two distinct strains or species of microbes are separately cultured, and biomass from both cultures is mixed prior to subjecting the biomass to a chemical reaction that modifies at least 1% of the lipid. In some embodiments, at least two of the distinct strains of microbes have different glycerolipid profiles.

[0026] In one aspect, the present invention is directed to a saponification method for making a soap. In some embodiments, the method includes culturing a population of microbes, harvesting microbial biomass that contains at least 5% lipid by DCW, including glycerolipids or fatty acid esters, and subjecting the biomass to an alkaline hydrolysis reaction to produce a soap from the chemical conversion of at least a portion of the glycerolipids or fatty acid esters to fatty acid salts. In some embodiments, the alkaline hydrolysis reaction includes contacting the biomass with a base and optionally heating the biomass. In some embodiments, the base is an alkali metal hydroxide such as NaOH or KOH. In some embodiments, less than 100% of the glycerolipids and fatty acid esters in the biomass are converted to fatty acid salts. In some embodiments, less than 1% of the glycerolipids and fatty acid esters in the biomass are converted to fatty acid salts.

[0027] In some embodiments of the saponification method, the method further comprises substantially separating the fatty acid salts from other components of the biomass. Some methods of the invention further comprise boiling the separated fatty acid salts in water and re-precipitating the fatty acid salts by introducing a salt into the aqueous solution to produce a purified soap. In some embodiments, the salt is a water-soluble alkali metal halide, such as NaCl or KCl.

[0028] Some saponification methods of the invention further comprise combining the purified soap or saponified oil composition with one or more additives selected from the group consisting of essential oils, fragrance oils, flavor oils, botanicals, extracts, CO_2 extracts, clays, colorants, titanium dioxide, micas, tinting herbs, glitters, exfoliants, fruit seeds, fibers, grain powders, nut meals, seed meals, oil beads, wax beads, herbs, hydrosols, vitamins, milk powders, preservatives, antioxidants, tocopherols, salts, sugars, vegetable oils, waxes, glycerin, sea vegetables, nutritive oils, moisturizing oils, vegetable butters, propylene glycol, parabens, honey, bees wax, aloe, polysorbate, cornstarch, cocoa powder, coral powder, humectants, gums, emulsifying agents, and thickeners. In one embodiment, the mixture is packaged as a cosmetics product. In another embodiment, the cosmetic product comprises a facial cleanser.

[0029] In some embodiments of the saponification method, the ratio of fatty acid salts to the biomass from which they are separated is between 10% fatty acid salts to 90% biomass and 90% fatty acid salts to 10% biomass by dry weight. In some methods, the biomass is subjected to the alkaline hydrolysis reaction without a step of prior enrichment that increases a ratio of lipid to non-lipid material in the biomass by more than 50% by weight. In some

methods, the harvested biomass is not subjected to treatments other than lysis before the alkaline hydrolysis reaction. In other methods, the biomass is subjected to the alkaline hydrolysis reaction with a step of prior enrichment that increases the ratio of lipid to non-lipid material in the biomass as compared to the ratio at harvesting. In some embodiments, the biomass subjected to the alkaline hydrolysis reaction contains components other than water in the same relative proportions as the biomass at harvesting. In some embodiments, lipid comprises no more than 90% of the biomass subjected to the alkaline hydrolysis reaction.

[0030] In some embodiments of the saponification method, the harvested biomass comprises a lipid content of at least 5%, at least 10%, at least 15%, at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, or at least 90% by DCW. In some embodiments, the lipid comprises at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, or at least 95% saturated fatty acid constituents.

[0031] In some embodiments, the saponification method further comprises disrupting the biomass prior to subjecting the biomass to the alkaline hydrolysis reaction. In some embodiments, disrupting the biomass comprises mechanically lysing the population of microbes to generate a lysate. In some embodiments, the oil is extracted from the biomass before saponification. In some embodiments, the extracted oil is substantially free of color or pigments.

[0032] In another aspect, the present invention is directed to a composition comprising a lighter phase containing fatty acid alkyl esters, and at least one heavier phase containing microbial biomass.

[0033] In various embodiments of the composition, at least 20% of the fatty acid alkyl esters are C18. In some embodiments, at least 30% of the fatty acid alkyl esters are C18. In some embodiments, at least 40% of the fatty acid alkyl esters are C18. In some embodiments, at least 50% of the fatty acid alkyl esters are C18. In some embodiments, at least 50% of the fatty acid alkyl esters are C16 or longer chain lengths. In some embodiments, at least 10% of the fatty acid alkyl esters are C14 or shorter chain lengths. In some embodiments., at least 20% of the fatty acid alkyl esters are C14 or shorter chain lengths.

[0034] In another aspect, the present invention is directed to a composition comprising a lighter phase containing completely saturated lipids and at least one heavier phase containing microbial biomass. In another aspect, the present invention is directed to a composition comprising a lighter phase containing lipids and at least one heavier phase containing

microbial biomass from more than one species or strain. In another aspect, the present invention is directed to a composition comprising a lighter phase containing hydroxylated lipids,and at least one heavier phase containing microbial biomass. In another aspect, the present invention is directed to a composition comprising a lighter phase containing free fatty acids and at least one heavier phase containing microbial biomass.

[0035] In another aspect, the present invention is directed to a composition comprising saponified oil derived from the alkaline hydrolysis of biomass produced by culturing a population of microbes. In some embodiments, the composition further comprises at least one and optionally more than one oil selected from the group of oils consisting of soy, rapeseed, canola, palm, palm kernel, coconut, corn, waste vegetable, Chinese tallow, olive, sunflower, cotton seed. chicken fat, beef tallow, porcine tallow, microalgae, macroalgae, Cuphea, flax, peanut, choice white grease, lard, Camelina sativa, mustard seed cashew nut, oats, lupine, kenaf, calendula, hemp, coffee, linseed (flax), hazelnut, euphorbia, pumpkin seed, coriander, camellia, sesame, safflower, rice, tung oil tree, cocoa, copra, pium poppy, castor beans, pecan, jojoba, jatropha, macadamia, Brazil nuts, avocado, a fossil oil or a distillate fraction thereof.

[0036] In various embodiments, the saponified oil composition can be a solid (including a powder), or a liquid. In some embodiments, the composition further comprises carotenoids derived from the biomass, and/or unsaponified glycerolipids derived from the biomass, and/or polysaccharides derived from the biomass. In some embodiments, the saponified oil comprises at least 50% of the composition's total mass. In some embodiments, the saponified oil comprises at least 75% of the composition's total mass. In other embodiments, the saponified oil comprises less than 50% of the composition's total mass. In other embodiments, the saponified oil comprises less than 25% of the composition's total mass. In some embodiments, components derived from the biomass constitute at least 50% of the composition's total mass. In some embodiments, components derived from the biomass constitute no more than 50% of the composition's total mass.

[0037] In another aspect, the present invention is directed to a kit comprising a saponified oil composition as described herein and an oral supplement. In some embodiments, the oral supplement comprises a vitamin or an herb.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0038] Figure 1 shows DCW per liter of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with and without additional glucose.

[0039] Figure 2 shows DCW per liter of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose.

[0040] Figure 3 shows relative lipid concentration of cultures of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose.

[0041] Figure 4 shows lipid concentration of cultures of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with and without additional glucose.

[0042] Figure 5 shows lipid as a percent of DCW of two species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose, wherein glycerol is added sequentially after glucose.

[0043] Figure 6 shows lipid as a percent of DCW of two species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose.

[0044] Figure 7 shows relative lipid concentration of cultures of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of 2% glucose and 1% glucose + 1% reagent grade glycerol.

[0045] Figure 8 shows lipid as a percent of DCW of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of glucose with and without reagent grade glycerol, wherein glycerol is added sequentially or in combination with glucose.

[0046] Figure 9 shows relative lipid concentration of cultures of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose, wherein glycerol is added sequentially or in combination with glucose.

[0047] Figure 10 shows DCW per liter of multiple species and strains of *Chlorella* when cultured in the presence of various types of glycerol with additional glucose, wherein glycerol is added sequentially or in combination with glucose.

[0048] Figure 11(a) shows lipid as a percent of DCW of *Spirulina platensis* when cultured in the presence of glucose, reagent grade glycerol, non-acidulated biodiesel byproduct glycerol, and a combination of glycerol and glucose.

[0049] Figure 11(b) shows lipid as a percent of DCW of *Navicula pelliculosa* when cultured in the presence of various types of glycerol and in the presence of combinations of glycerol and glucose.

[0050] Figure 12(a) shows lipid as a percent of DCW of *Scenedesmus armatus* when cultured in the presence of various types of glycerol and in the presence of a combination of glycerol and glucose.

[0051] Figure 12(b) shows DCW per liter of *Scenedesmus armatus* when cultured in the presence of various types of glycerol and in the presence of a combination of biodiesel byproduct glycerol and glucose.

[0052] Figure 13 shows DCW per liter of *Navicula pelliculosa* when cultured in the presence of various types of glycerol and in the presence of a combination of non-acidulated biodiesel byproduct glycerol and glucose.

[0053] Figures 14(a) and (b) shows DCW per liter of *Scenedesmus armatus* and *Navicula pelliculosa* when cultured in the presence of acidulated and non-acidulated biodiesel byproduct glycerol with additional glucose, wherein glycerol is added sequentially or in combination with glucose.

[0054] Figure 15 shows a synergistic effect of a combination of xylose and glucose on growth of *Chlorella* compared to xylose or glucose alone.

[0055] Figure 16 shows growth of *Chlorella protothecoides* on glucose and fructose.

[0056] Figure 17 shows DCW per liter of *Chlorella protothecoides* when cultured in the presence of glucose, sucrose, or one of several molasses samples (designated BS1, BS2 and HTM) in the presence or absence of a sucrose invertase.

[0057] Figure 18 shows growth of *Chlorella protothecoides* when cultured in the presence of glucose, sucrose, or one of several molasses samples (designated BS1, BS2 and HTM) in the presence or absence of a sucrose invertase as measured by relative cell density.

[0058] Figure 19 shows a visual comparison of oil that was hexane extracted from strain UTEX 1435 compared to oil extracted from UTEX 250.

[0059] Figure 20 shows high oil algae cells embedded in soap.

[0060] Figures 21a-c show a Cladogram comparing the genomic DNA sequences of 23s rRNA from 8 different strains of *Chlorella protothecoides*.

[0061] Figures 22-27 show the growth curve of different strains of microalgae grown on three different concentrations of pure sorghum as the sole carbon source.

[0062] Figure 28 shows a summary of diversity of lipid chains in microalgal species.

[0063] Figures 29a-i show a Cladogram comparing the genomic DNA sequences of 23S rRNA from 23 strains of microalgae.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. DEFINITIONS

[0064] Definitions of certain terms used herein are provided below for the convenience of the reader.

[0065] "Active in microalgae," with reference to a nucleic acid, refers to a nucleic acid that is functional in microalgae. For example, a promoter that has been used to drive an antibiotic resistance gene to impart antibiotic resistance to a transgenic microalgae is active in microalgae. Examples of promoters active in microalgae include promoters endogenous to certain algae species and promoters found in plant viruses.

[0066] "Acyl carrier protein" or "ACP" is a protein that binds a growing acyl chain during fatty acid synthesis as a thiol ester at the distal thiol of the 4'-phosphopantetheine moiety and comprises a component of the fatty acid synthase complex. The phrase "naturally co-expressed" with reference to an acyl carrier protein in conjunction with a fatty acyl-ACP thioesterase means that the ACP and the thioesterase are co-expressed naturally (in nature) in a tissue or organism from which they are derived, e.g., because the genes encoding the two enzymes are under the control of a common regulatory sequence or because they are expressed in response to the same stimulus.

[0067] "Acyl-CoA molecule" or "acyl-CoA" is a molecule comprising an acyl moiety covalently attached to coenzyme A through a thiol ester linkage at the distal thiol of the 4'-phosphopantetheine moiety of coenzyme A.

[0068] "Axenic" means a culture of an organism that is free from contamination by other living organisms.

[0069] "Biodiesel" refers to a fatty acid ester produced from the transesterification of lipid. The ester can be a methyl ester, ethyl ester, or other ester depending on the components of the transesterification reaction.

[0070] "Biomass" refers to material produced by growth and/or propagation of cells. Biomass may contain cells and/or intracellular contents as well as extracellular material. Extracellular material includes, but is not limited to, compounds secreted by a cell.

[0071] "Bioreactor" means an enclosure or partial enclosure in which cells, e.g., microorganisms, are cultured, optionally in suspension.

[0072] "Catalyst" refers to an agent, such as a molecule or macromolecular complex, capable of facilitating or promoting a chemical reaction of a reactant to a product without becoming a part of the product. A catalyst thus increases the rate of a reaction, after which,

the catalyst may act on another reactant to form the product. A catalyst generally lowers the overall activation energy required for the reaction such that the reaction proceeds more quickly or at a lower temperature and/or a reaction equilibrium may be more quickly attained. Examples of catalysts include enzymes, which are biological catalysts, and heat, which is a non-biological catalyst.

[0073] "Cellulosic material" means the products of digestion of cellulose, such as glucose, xylose, arabinose, disaccharides, oligosaccharides, lignin, furfurals and other molecules.

[0074] "Co-culture", and variants thereof such as "co-cultivate", refer to the presence of two or more types of cells in the same bioreactor. The two or more types of cells may both be microorganisms, such as microalgae, or may be a microalgal cell cultured with a different cell type. The culture conditions may be those that foster growth and/or propagation of the two or more cell types or those that facilitate growth and/or propagation of one cell type, or a subset of the cell types, of the two or more cell types while maintaining cellular growth for the remainder.

[0075] "Cofactor" is used herein to refer to any molecule, other than the substrate, that is required for an enzyme to carry out its enzymatic activity.

[0076] "Complementary DNA" ("cDNA") is a DNA copy of an mRNA, which can be obtained, for example, by reverse transcription of messenger RNA (mRNA) or amplification (e.g., via polymerase chain reaction ("PCR")).

[0077] "Cultivated" and variants thereof refer to the intentional fostering of growth (increases in cell size, cellular contents, and/or cellular activity) and/or propagation (increases in cell numbers via mitosis) of one or more cells by use of appropriate culture conditions. The combination of both growth and propagation may be termed proliferation. The one or more cells may be those of a microorganism, such as microalgae. Examples of appropriate conditions include the use of a defined medium (with known characteristics such as pH, ionic strength, and carbon source), specified temperature, oxygen tension, and carbon dioxide levels in a bioreactor. The term does not refer to the growth or propagation of microorganisms in nature or otherwise without direct human intervention, such as natural growth of an organism that ultimately becomes fossilized to produce geological crude oil.

[0078] "Exogenous gene" refers to a nucleic acid transformed (introduced) into a cell. A transformed cell may be referred to as a recombinant cell, into which additional exogenous gene(s) may be introduced. The exogenous gene may be from a different species (and so heterologous) or from the same species (and so homologous) relative to the cell being

transformed. In the case of a homologous gene, the introduced gene occupies a different location in the genome of the cell relative to the endogenous copy of the gene or is under different regulatory controls of the endogenous gene it replaces or both. The exogenous gene may be present in more than one copy in the cell. The exogenous gene may be maintained in a cell as an insertion into the genome or as an episomal molecule.

[0079] "Exogenously provided" describes a molecule provided to the culture media of a cell culture.

[0080] "Extracted" refers to oil or lipid separated from aqueous biomass with or without the use of solvents.

[0081] "Fatty acyl-ACP thioesterase" is an enzyme that catalyzes the cleavage of a fatty acid from an acyl carrier protein (ACP) during lipid synthesis.

[0082] "Fixed carbon source" means molecule(s) containing carbon, typically organic molecules, that are present at ambient temperature and pressure in solid or liquid form.

[0083] "Fungus," as used herein, means heterotrophic organisms characterized by a chitinous cell wall from the kingdom of fungi.

[0084] "Heteroatom" means an atom other than carbon or hydrogen. Examples of heteroatoms are magnesium, calcium, potassium, sodium, sulfur, phosphorus, iron, and copper.

[0085] "Homogenate" means biomass that has been physically disrupted.

[0086] "Hydrophobic fraction" refers to the portion, or fraction, of a material that is more soluble in a hydrophobic phase than in an aqueous phase. A hydrophobic fraction is substantially immiscible with water and usually non-polar.

[0087] "Increased lipid yield" refers to an increase in the lipid productivity of a microbial culture, which can be achieved by, for example, increasing dry weight of cells per liter of culture, increasing the percentage of cells that constitute lipid, or increasing the overall amount of lipid per liter of culture volume per unit time.

[0088] "Inducible promoter" is a promoter that mediates transcription of an operably linked gene in response to a particular stimulus.

[0089] "In operable linkage" refers to a functional linkage between two nucleic acid sequences, such as a control sequence (typically a promoter) and the linked sequence. A promoter is in operable linkage with an exogenous gene if it can mediate transcription of the gene.

[0090] "In situ" means "in place" or "in its original position". For example, a culture may contain a first microorganism, such as a microalgae, secreting a catalyst and a second microorganism secreting a substrate, wherein the first and second microorganisms produce the components necessary for a particular chemical reaction to occur in situ in the co-culture without requiring further separation or processing of the materials.

[0091] "Lipase" is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of ester bonds in lipid substrates. Lipases catalyze the hydrolysis of lipids into glycerols and fatty acids, and can function to catalyze the transesterification of TAGs to fatty acid alkyl esters.

[0092] "Lipids" are lipophilic molecules that can be obtained from microorganisms. The main biological functions of lipids include storing energy, acting as structural components of cell membranes, and serving as signaling molecules, although they perform other functions as well. Lipids are soluble in nonpolar solvents (such as ether and chloroform) and are relatively insoluble in water. Lipids consist largely of long, hydrophobic hydrocarbon "tails." Examples of lipids include fatty acids (saturated and unsaturated); glycerides or glycerolipids (such as monoglycerides, diglycerides, triglycerides (including TAGs) or neutral fats, and phosphoglycerides or glycerophospholipids); nonglycerides (sphingolipids, sterol lipids including cholesterol and steroid hormones, prenol lipids including terpenoids, waxes, and polyketides); and complex lipid derivatives (sugar-linked lipids, or glycolipids, and protein-linked lipids). Other examples of lipids include free fatty acids; esters of fatty acids; sterols; pigments (e.g., carotenoids and oxycarotenoids); xanthophylls, phytosterols, ergothionine, lipoic acid, antioxidants including beta-carotene and tocopherol. Also included are polyunsaturated fatty acids such as arachidonic acid, stearidonic acid, cholesterol, desmesterol, astaxanthin, canthaxanthin, and n-6 and n-3 highly unsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid (DHA).

[0093] A "lipid pathway enzyme" is an enzyme involved in lipid metabolism, i.e., either lipid synthesis, modification, or degradation, and includes, without limitation, lipases, fatty acyl-ACP thioesterases, and acyl carrier proteins.

[0094] A "limiting concentration of a nutrient" is a nutrient concentration in a culture that limits the propagation of a cultured organism. A "non-limiting concentration of a nutrient" is a nutrient concentration that can support maximal propagation during a given culture period. Thus, the number of cells produced during a given culture period is lower in the presence of a limiting concentration of a nutrient than when the nutrient is non-limiting. A nutrient is said

to be "in excess" in a culture when the nutrient is present at a concentration greater than that which supports maximal propagation.

[0095] "Glycerolipid profile" refers to the distribution of different carbon chain lengths and saturation levels of glycerolipids in a particular sample of biomass. For example, a sample could contain glycerolipids in which approximately 60% of the glycerolipid is C18:1, 20% is C18:0, 15% is C16:0, and 5% is C14:0. Where a carbon length is referenced without regard to saturation, as in "C18", such reference can include any amount of saturation; for example, microbial biomass that contains 20% lipid as C18 can include C18:0, C18:1, C18:2, etc., in equal or varying amounts, the sum of which constitute 20% of the microbial biomass.

[0096] "Lysate" refers to a solution containing the contents of lysed cells. "Lysing" refers to disrupting the cellular membrane and optionally cell wall of a cell sufficient to release at least some intracellular contents. "Lysis" refers to the breakage of the plasma membrane and optionally the cell wall of a biological organism sufficient to release at least some intracellular contents, often by mechanical, viral or osmotic mechanisms that compromise its integrity.

[0097] "Microalgae" means a microbial organism that is either (a) eukaryotic and contains a chloroplast or chloroplast remnant, or (b) a cyanobacteria. Microalgae include obligate photoautotrophs, which cannot metabolize a fixed carbon source as energy, as well as heterotrophs, which can live solely off of a fixed carbon source. Microalgae can refer to unicellular organisms that separate from sister cells shortly after cell division, such as *Chlamydomonas.*, as well as to microbes such as, for example, *Volvox*, which is a simple multicellular photosynthetic microbe of two distinct cell types. "Microalgae" also includes other microbial photosynthetic organisms that exhibit cell-cell adhesion, such as *Agmenellum*, *Anabaena*, and *Pyrobotrys*, as well as organisms that contain chloroplast-like structures that are no longer capable of performing photosynthesis, such as microalgae of the genus *Prototheca* and some dinoflagellates.

[0098] "Microorganism" and "microbe" are used interchangeably herein to refer to microscopic unicellular organisms.

[0099] "Oil" means a hydrophobic, lipophilic, nonpolar carbon-containing substance including but not limited to geologically-derived crude oil, distillate fractions of geologically-derived crude oil, vegetable oil, algal oil, and microbial lipids.

[0100] "Oleaginous yeast," as used herein, means yeast that can accumulate more than 10% of DCW as lipid. Oleaginous yeast includes yeasts such as *Yarrowia lipolytica*, as well as

engineered strains of yeast such as *Saccharomyces cerevisiae* that have been engineered to accumulate more than 10% of the DCW as lipid.

[0101] "Osmotic shock" refers to the rupture of bacterial, algal, or other cells in a solution following a sudden reduction in osmotic pressure. Osmotic shock is sometimes induced to release cellular components into a solution.

[0102] "Photobioreactor" refers to a container, at least part of which is at least partially transparent or partially open, thereby allowing light to pass through, in which one or more microalgae cells are cultured. Photobioreactors may be closed, as in the instance of a polyethylene bag or Erlenmeyer flask, or may be open to the environment, as in the instance of an outdoor pond.

[0103] A "polysaccharide-degrading enzyme" refers to an enzyme capable of catalyzing the hydrolysis, or depolymerization, of any polysaccharide. For example, cellulases are polysaccharide degrading enzymes that catalyze the hydrolysis of cellulose.

[0104] "Polysaccharides" (or "glycans") are carbohydrates made up of monosaccharides joined together by glycosidic linkages. Cellulose is an example of a polysaccharide that makes up certain plant cell walls. Cellulose can be depolymerized by enzymes to yield monosaccharides such as xylose and glucose, as well as larger disaccharides and oligosaccharides.

[0105] "Port," in the context of a bioreactor, refers to an opening in the bioreactor that allows influx or efflux of materials such as gases, liquids, and cells. Ports are usually connected to tubing leading from the photobioreactor.

[0106] "Recombinant," when used with reference, e.g., to a cell, or nucleic acid, protein, or vector, indicates that the cell, nucleic acid, protein, or vector, has been modified by the introduction of a heterologous nucleic acid or protein or the alteration of a native (naturally occurring) nucleic acid or protein, or that the cell is derived from a cell so modified. Thus, e.g., recombinant cells express non-native genes, genes not found in the native (non-recombinant) form of the cell, or express native genes differently than does the non-recombinant cell, i.e., the native gene is over-expressed, under-expressed or not expressed at all, relative to gene expression in the non-recombinant cell. "Recombinant nucleic acid" refers to a nucleic acid, typically formed *in vitro* by the manipulation of nucleic acid, e.g., using polymerases and endonucleases, in a form not found in nature (and can include purified preparations of naturally occurring nucleic acids). Thus, an isolated nucleic acid, in a linear form, or an expression vector formed *in vitro* by ligating DNA molecules that are not

normally joined (for example to place two different nucleic acids in operable linkage with one another), are recombinant. Once a recombinant nucleic acid is introduced into a host cell or organism, it may replicate non-recombinantly, i.e., using the *in vivo* cellular machinery of the host cell; however, such nucleic acids, produced recombinantly and subsequently replicated non-recombinantly, are still considered recombinant. Similarly, a "recombinant protein" is a protein made using recombinant techniques, i.e., through the expression of a recombinant nucleic acid.

[0107] "Saponified oil" refers to the carboxylic acid salts and associated compounds that are created during saponification of fatty acid esters from microbial sources. Fatty acid esters can be derived from the triacylglycerols (TAGs) produced by microorganims. Compounds associated with oils from microbial sources include carotenoids, tocopherols, tocotrienols, and other compounds of biological origin.

[0108] "Sonication" refers to a process of disrupting biologic materials, such as a cell, by use of sound wave energy.

[0109] "Stover" refers to the dried stalks and leaves of a crop remaining after a grain has been harvested.

[0110] A "sucrose utilization gene" is a gene that, when expressed, aids the ability of a cell to utilize sucrose as an energy source. Sucrose transporters, sucrose invertases, and hexokinases such as glucokinases and fructokinases are examples of sucrose utilization genes.

II. GENERAL

[0111] Certain microorganisms can be used to produce lipids in large quantities for use in the transportation fuel and petrochemical industries, among other applications. The present invention provides methods that significantly decrease the cost and increase the efficiency of obtaining lipids and valuable lipid-derived compounds form microorganisms. Suitable microorganisms for use in the methods of the invention include microalgae, oleaginous yeast, fungi, bacteria, and cyanobacteria. A genus of microalgae for use in the invention is the lipid-producing microalgae *Chlorella*. The present invention also provides methods for the in situ transesterification of triacylglycerols (TAGs) to fatty acid alkyl esters, which are useful as biodiesel fuels and/or for other applications, as well as other methods for chemical modification of the lipids in microbial biomass.

[0112] The present invention also provides methods of making fatty acid alkyl esters (*e.g.*, fatty acid methyl esters (FAME)) by culturing a population of microbes that generate at least

5% of their DCW as lipid, such as triglycerides. In this method, the microbial biomass is harvested from the culture and optionally dried to remove water. Transesterification is then accomplished by the addition of a lower-alkyl alcohol and a catalyst (*e.g.*, NaOH) to generate a lipophilic phase containing the fatty acid alkyl esters and a hydrophilic phase containing hydrophilic cell material. The lipophilic phase can be readily separated from the hydrophilic phase.

[0113] The direct transesterification of the biomass, without an intervening separation process step in which the lipophilic components are extracted from the biomass prior to transesterification, permits production of biodiesel at greatly reduced costs, as compared to methods which employ traditional extraction and refining steps prior to transesterification.

[0114] The methods of the present invention provide further advantages in the generation of biodiesel via the in situ transesterification of glycerolipids to fatty acid alkyl esters. In particular, the microbes of the present invention can be cultured under conditions which permit modulation of the glycerolipid content of the cells. Surprisingly, it has been discovered that a greater proportion of total glycerolipids can be converted to fatty acid alkyl esters in cells which comprise increasingly higher oil:non-oil ratios as a function of DCW. Moreover, these higher oil:non-oil ratios also lead to another unexpected advantage: fatty acid alkyl esters generated from cells that comprise increasingly higher oil:non-oil ratios have a lower concentration of heteroatoms than those produced from cells with lower oil:non-oil ratios. The methods provided contrast markedly with current dogma in the field, namely that photoautotrophic growth of microalgae is the best method of microalgae cultivation for biofuel production (see for example, Rodolfi, et al., *Biotechnology & Bioengineering* 102(1):100-112 (2008) for discussion on screening microalgal strains for their biomass productivity and lipid content for growth in an outdoor photobioreactor). It was also discovered that the higher the oil content of the biomass, the higher quality of the resulting product after direct chemical modification. The present invention provides heterotrophic methods of culturing microbes (e.g., microalgae) to achieve higher oil content for direct chemical modification for the production of higher quality chemical products.

[0115] The present invention also provides other methods of chemically modifying lipid-containing microbial biomass, including without limitation, hydrogenation, interesterification, hydroxylation, hydrolysis, and saponification. These methods can be used with the various microorganisms and culturing conditions set forth herein to produce a wide variety of chemical products for a multitude of applications.

[0116] The present invention also provides useful compositions, including: a composition comprising a lighter phase containing fatty acid alkyl esters and at least one heavier phase containing microbial biomass; a composition comprising a lighter phase containing completely saturated lipids and at least one heavier phase containing microbial biomass; a composition comprising a lighter phase containing lipids and at least one heavier phase containing microbial biomass from more than one species or strain; a composition comprising a lighter phase containing hydroxylated lipids and at least one heavier phase containing microbial biomass; and a composition comprising a lighter phase containing free fatty acids and at least one heavier phase containing microbial biomass. The present invention also provides compositions comprising saponified oil derived from the alkaline hydrolysis of biomass produced by culturing a population of microorganisms.

III. MICROORGANISMS

[0117] Microorganisms useful in the invention produce lipids suitable for chemical modification for biodiesel production and for production of fatty acid esters for other purposes such as industrial chemical feedstocks and edible oils, as well as the production of other chemical entities. Suitable lipids for biodiesel and chemicals production include TAGs containing fatty acid molecules. In some embodiments, suitable fatty acids contain at least 8, at least 10, at least 12, at least 14, at least 16, at least 18, at least 20, at least 22, at least 24, at least 26, at least 28, at least 30, at least 32, or at least 34 carbon atoms or more. Preferred fatty acids for biodiesel generally contain 16 and 18 carbon atoms. In certain embodiments, the above fatty acids are saturated (with no carbon-carbon double or triple bonds); mono unsaturated (single double bond); polyunsaturated (two or more double bonds); are linear (not cyclic); and/or have little or no branching in their structures.

[0118] In some embodiments, culturing microorganisms useful in the in situ transesterification and modification methods of the present invention yields a biomass that, when dry, comprises an oil content of at least 5%, at least 10%, at least 15%, at least 20%, or at least 25%. In other embodiments, the dried biomass comprises an oil content of at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, or at least 90%. "Dry" or "dried," as used in this context, refers to the absence of substantially all water. Biomass can also be chemically modified without being dried; for example, biomass includes a centrifuged cell paste.

[0119] In some embodiments, culturing microorganisms useful in the in situ transesterification and other chemical modification methods of the invention yields a biomass in which at least 10% of the lipid is C18, at least 15% of the lipid is C18, at least 20% of the lipid is C18, or at least 25% of the lipid is C18. In other embodiments, the biomass comprises a lipid constituent which is at least 30% C18, at least 35% C18, at least 40% C18, at least 45% C18, or at least 50% C18. In still other embodiments, the biomass can comprise a lipid component that is at least 10%, at least 15%, at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, or at least 50% C14 and/or C16, or longer chain lengths. Alternatively, the biomass can comprise a lipid component that is at least 10% or at least 20% C14, or shorter chain lengths.

[0120] The microorganims useful in the methods of the present invention can be naturally occurring or genetically engineered to increase lipid yield, to generate TAGs comprising higher proportions of desirable carbon chain length (*e.g.*, C18) fatty acids, or to use particular feedstocks (*e.g.*, molasses) as an energy and carbon source. Such genetic engineering modifications are described below under the header "Lipid Pathway Engineering."

[0121] Any species of microorganism that produces suitable lipid can be used in the methods of the invention, although microorganisms that naturally produce high levels of suitable lipid are typically preferred. In addition, microorganisms that can produce high levels of lipid as a percentage of DCW when subjected to specific fermentation conditions are also preferred. Microalgae can be used in the methods of the invention, and nonlimiting examples of microalgae, both genus and species, that can be used in the methods of the present invention are listed in Table 1.

[0122] Table 1. Examples of microalgae.

Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri,

Chlorella lobophora (strain SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (including any of UTEX strains 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta, Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEX LB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp., Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, 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*

[0123] Nonlimiting examples of oleaginous yeast that can be used in the methods of the present invention are listed in Table 2.

[0124] Table 2. Examples of oleaginous yeast.

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

[0125] Nonlimiting examples of fungi that can be used in the methods of the present invention are listed in Table 3.

[0126] Table 3. Examples of fungi.

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

[0127] Considerations affecting the selection of a microorganism for use in the invention include, in addition to production of suitable lipids for biodiesel production: (1) high lipid content as a percentage of cell weight; (2) ease of growth;; and (3) ease of processing. Preferred microorganisms grow heterotrophically (on sugar in the absence of light) or have been engineered to do so using, for example methods disclosed in U.S. Patent Application Nos. 60/941,581 (filed June 1, 2007), 60/959, 174 (filed July 10, 2007), 60/968, 291 (filed August 27,2007) and 61/024, 069 (filed January 28, 2008).

[0128] Processing considerations can include, for example, the availability of effective means for lysing the cells. Bacteria can also be used in the methods of the invention invention, particularly oleaginous bacteria such as species of the genus *Rhodococcus*, such as *Rhodococcus opacus* and *Rhodococcus sp.*

[0129] Species of microalgae for use in the methods of the invention can be identified by amplification of certain target regions of the genome of a test microalgae. For example, identification of a specific species or strain of microalgae can be achieved through

amplification and sequencing of nuclear and/or chloroplast DNA using primers and methodology using any region of the genome (see, *e.g.*, Wu *et al., Bot. Bull. Acad. Sin.* (2001) 42:115-121 "Identification of *Chlorella spp.* Isolates using ribosomal DNA sequences"). Well established methods of phylogenetic analysis, such as amplification and sequencing of ribosomal internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2 rDNA), 23S rRNA, 18s rRNA, and other conserved genomic regions can be used to identify species of microalgal and other hydrocarbon and lipid producing organisms that can be used in the methods disclosed herein. For examples of methods of identification and classification of algae, see also, *e.g.*, *Genetics,* 2005 Aug; 170(4):1601-10 and *RNA,* 2005 Apr,11(4):361-4.

[0130] Genomic DNA comparisons can also be used to identify suitable species of microalgae for use in the methods of the present invention. Regions of conserved DNA, including, but not limited to, DNA encoding 23S rRNA, can be amplified from microalgal species and compared to consensus sequences to screen for microalgal species that are taxonomically related to a microalgae used in a method of the present invention. Examples of such DNA sequence comparison for species within the *Chlorella* and *Prototheca* genus are shown below in the Examples.

[0131] In some embodiments, microalgae for use in the methods of the present invention have genomic DNA sequences encoding 23S rRNA that have at least 99%, at least 98%, at least 97%, at least 96%, at least 95%, at least 94%, at least 93%, at least 92%, at least 91%, at least 90%, at least 89%, at least 88%, at least 87%, or at least 86% nucleotide identity to at least one of the sequences listed in SEQ ID NOs:3-6. In other embodiments, microalgae for use in the methods of the present invention have genomic DNA sequences encoding 23S rRNA that have at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 65% or at least 60% nucleotide identity to at least one of the sequences listed in SEQ ID NOs:3-29.

[0132] *Chlorella* is a genus of single-celled green algae, belonging to the phylum Chlorophyta, that can be used in the methods of the present invention. *Chlorella* is spherical in shape, about 2 to 10 μm in diameter, and is without flagella. Some species of *Chlorella* are naturally heterotrophic. *Chlorella*, particularly *Chlorella protothecoides*, is a preferred microorganism for use in the invention because of its high composition of lipid, particularly long-chain lipid suitable for biodiesel and chemical modification into other molecules. In addition, this microalgae grows heterotrophically.

[0133] *Prototheca* is a genus of single-cell microalgae thought to be a non-photosynthetic mutant of *Chlorella* that is useful in the methods of the present invention. While *Chlorella*

can obtain its energy through photosynthesis, species of the genus *Prototheca* are obligate heterotrophs. *Prototheca* are spherical in shape, about 2 to 15 micrometers in diameter, and without flagella. *Prototheca*, particularly *Prototheca moriformis*, is a preferred microorganism for use in the invention because of its lipid composition, particularly saturated lipids suitable for saponification. In addition, the lipid extracted from this microalgae has very few colorant contaminants, further making it suitable for saponification.

[0134] As with both plants and animals, algae and other microbes store excess energy in the form of lipids for use when other sources of energy (*e.g.*, sunlight) are unavailable. Moreover, modulation of oil content allows algae living in an aqueous environment to float and thereby optimize access to sunlight to carry out photosynthetic processes. The ability to modify buoyancy via modulation of oil content has led to microalgal cells that can generate high cellular oil concentrations as compared to higher plants. The characteristic of high oil content is advantageous for in situ chemical modification of oil-bearing biomass, because, as demonstrated herein, high-oil bio
mass yields higher purity TAG derivatives compared to low-oil biomass, particularly photosynthetically-derived low-oil biomass. Accordingly, microorganisms that can be used to generate high-oil biomass are preferred for use in the methods of the present invention.

A. Growth Methods

[0135] Microrganisms can be cultured both for purposes of conducting optional genetic manipulations and for the production of lipids. The former type of culture is conducted on a small scale and, at least initially, under conditions in which the starting microorganism can grow. For example, if the starting microorganism is a photoautotroph, the initial culture is conducted in the presence of light. The culture conditions can be changed if the microorganism is evolved or engineered to grow independently of light. Culture for purposes of lipid production is usually conducted on a large scale.

1. **Photosynthetic Growth Methods**

[0136] Photosynthetic microorganisms, such as microalgae, can be grown in the presence of light in a liquid culture medium that may be contained, for example, in a photobioreactor. The number of photons striking a culture of microalgae cells can be manipulated, as well as other parameters, such as the wavelength spectrum and ratio of dark:light hours per day. Microalgae can also be cultured in natural light, as well as simultaneous and/or alternating combinations of natural light and artificial light. For example, microalgae of the genus

Chlorella can be cultured under natural light during daylight hours and under artificial light during night hours.

[0137] The gas content of a photobioreactor to grow microorganisms such as microalgae can be manipulated. Part of the volume of a photobioreactor can contain gas rather than liquid. Gas inlets can be used to pump gases into the photobioreactor. Any gas can be pumped into a photobioreactor, including air, air/CO_2 mixtures, noble gases such as argon and other gases. The rate of entry of gas into a photobioreactor can also be manipulated. Increasing gas flow into a photobioreactor increases the turbidity of a culture of microalgae. The placement of ports conveying gases into a photobioreactor can also affect the turbidity of a culture at a given gas flow rate. Air/CO_2 mixtures can be modulated to generate optimal amounts of CO_2 for maximal growth by a particular organism. Microalgae grow significantly faster in the light under, for example, 3% CO_2/97% air than in 100% air. 3% CO_2/97% air has approximately 100-fold more CO_2 than air. For example, air:CO_2 mixtures of about 99.75% air:0.25% CO_2, about 99.5% air:0.5% CO_2, about 99.0% air:1.00% CO_2, about 98.0% air:2.0% CO_2, about 97.0% air:3.0% CO_2, about 96.0% air:4.0% CO_2, and about 95.00% air:5.0% CO_2 can be infused into a bioreactor or photobioreactor in accordance with the present methods. A 5% CO_2:95% air mixture infused into a photobioreactor containing *Botryococcus* cells is reported in *J Agric Food Chem.* 2006 Jun 28;54(13):4593-9; *J Biosci Bioeng.* 1999;87(6):811-5; and *J Nat Prod.* 2003 Jun;66(6):772-8).

[0138] Microalgae can be grown and maintained in closed photobioreactors made of any of a variety of different types of transparent or semitransparent material. Such material includes Plexiglas® enclosures, glass enclosures, bags made from substances such as polyethylene, transparent or semitransparent pipes, and other materials. Microalgae can also be grown and maintained in open photobioreactors such as raceway ponds, settling ponds, and other non-enclosed containers.

[0139] "Algal shading" refers to the inability of a light source to penetrate and reach all cells of a photosynthetic culture. Cells nearest the light source will "shade" (by virtue of their physical presence and absorption of photons in the chloroplasts) those cells further from the light source and thereby limit the exposure of those other cells to the energy needed to convert a carbon feedstock into lipids or other materials necessary for cell growth and reproduction. By mixing the culture, one can provide a mechanism to expose all cells to the light source, but "shading" nevertheless impacts the total duration of exposure, leading to slower growth and lower oil content as a percentage of DCW. As a result, longer growth

periods may be required to achieve high densities of cells and/or high oil content. Even after extended periods of growth, cells grown on light as a sole energy source rarely contain more than 15% oil as a percentage of DCW. In addition, photosynthetic growth of microalgae results in high levels of chlorophyll in the biomass, leading to much higher quantities of magnesium in directly transesterified biomass, because magnesium is a component of chlorophyll, and chlorophyll is a highly hydrophobic compound that accumulates in the lipophilic phase. In addition, higher carotenoid levels accumulate in algae grown photosynthetically than in algae grown heterotrophically.

2. Heterotrophic Growth Methods for Lipid Production

[0140] In contrast to photosynthetic growth methods, microalgae can be cultured in liquid media with the culture contained in a bioreactor that does not allow light to enter. Heterotrophic culture methods such as these rely on the use of a fixed carbon source (*e.g.*, glucose, glycerol, cellulosics, etc.) to provide energy for growth and lipid production. Culture condition parameters can be manipulated to optimize total lipid production.

[0141] Microalgal culture media typically contain components such as a fixed nitrogen source, trace elements, optionally a buffer for pH maintenance, and phosphate. Other components can include a fixed carbon source such as acetate or glucose and salts such as sodium chloride, particularly for seawater microalgae. Examples of trace elements include zinc, boron, cobalt, copper, manganese, and molybdenum in, for example, their respective forms of $ZnCl_2$, H_3BO_3, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ and $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$. These and other culture parameters, such as the pH of the culture media, the identity and concentration of trace elements and other media constituents, can also be manipulated in the methods of the invention to achieve a desired production result.

[0142] For organisms able to grow on a fixed carbon source, the fixed carbon source can be, for example, glucose, fructose, sucrose, galactose, xylose, mannose, rhamnose, glycerol, cellulosic sources, and/or floridoside. The one or more carbon source(s) can be supplied at a concentration of at least about 50 μM, at least about 100 μM, at least about 500 μM, at least about 5 mM, at least about 50 mM, and at least about 500 mM, of one or more exogenously provided fixed carbon source(s). For multiple species of *Chlorella*, for example, heterotrophic growth results in high production of biomass and accumulation of high lipid content in cells.

[0143] For lipid production, cells, including recombinant cells, are typically cultured or fermented in large quantities. The culturing may take place in large liquid volumes, such as in

suspension cultures as an example. Other examples include starting with a small culture of cells that is expanded into a large biomass by cell growth and propagation concurrently with lipid production. Bioreactors or steel fermentors can be used to accommodate large culture volumes. A fermentor similar those used in the production of beer and/or wine is suitable, as are the very large fermentors used in the production of ethanol.

[0144] Appropriate nutrient sources for culture in a fermentor are provided. These include raw materials such as one or more of the following: a fixed carbon source such as glucose, corn starch, depolymerized cellulose, sucrose, sugar cane, sugar beet, lactose, milk whey, or molasses; a fat source, such as fats or vegetable oils; a nitrogen source, such as protein, soybean meal, cornsteep liquor, ammonia (pure or in salt form), nitrate or nitrate salt, or molecular nitrogen; and a phosphorus source, such as phosphate salts. Additionally, a fermentor allows for the control of culture conditions such as temperature, pH, oxygen tension, and carbon dioxide levels. Gaseous components, like oxygen or nitrogen, can be bubbled through a liquid culture.

[0145] A fermentor can be used to allow cells to undergo the various phases of their growth cycle. As an example, an inoculum of lipid-producing cells can be introduced into a medium followed by a lag period (lag phase) before the cells begin growth. Following the lag period, the growth rate increases steadily and enters the log, or exponential, phase. The exponential phase is typically followed by a slowing or complete cessation of cell division due to decreases in nutrients, nitrogen in particular. After slowing, growth stops, and the cells enter a steady state of converting a fixed carbon feedstock into a desired product, such as a TAG. Maintaining the steady state for a longer period of time results in a higher percentage of DCW being the desired product, such as lipid in the case of the microorganisms described herein. In some instances, it is desirable to maintain the microbial cells in a steady state in which the cells convert a carbohydrate such as glucose into lipid while not undergoing cell division for an extended period of time to generate microbial biomass with more than 30%, more than 40%, more than 50%, or more than 60% lipid as a percentage of the dry weight of the cells. Nitrogen limitation is generally sufficient to prevent cells from undergoing cell division.

[0146] Microorganisms grown using conditions described herein and known in the art can comprise at least 20% lipid by weight, preferably at least 40% lipid by weight, more preferably at least 50% lipid by weight, more preferably at least 60% lipid by weight, more preferably at least 70% lipid by weight, and most preferably at least 80% lipid by weight. In

some embodiments, microorganisms are cultured using conditions described herein to attain a lipid component of at least 20% by weight within a culture period of no more than 1 week. In some embodiments, the culture period is no more than 14 days, no more than 13 days, no more than 12 days, no more than 11 days, no more than 10 days, no more than 9 days, no more than 8 days, no more than 6 days, no more than 5 days, no more than 4 days, or no more than 3 days. In any one of the foregoing culture periods, the microorganisms may yield at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, or at least 90% lipid by DCW. In some embodiments, microorganisms are cultured using conditions described herein to attain a lipid component of at least 20% by weight within a culture period of at least 2 days. In some embodiments, the culture period is at least 3 days, at least 4 days, at least 5 days, at least 6 days, at least 7 days or at least 8 days. In any one of the foregoing culture periods, the microorganisms may yield at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, or at least 90% lipid by DCW.

[0147] Process conditions can be adjusted to increase the yield of lipids suitable for use as biodiesel or other target molecules and/or to reduce production cost. For example, in certain embodiments, a microbe (*e.g.*, a microalgae) is cultured in the presence of a limiting concentration of one or more nutrients, such as, for example, nitrogen. This condition tends to increase microbial lipid yield over microbial lipid yield in a culture in which nitrogen is provided in excess. In particular embodiments, the increase in lipid yield is at least about: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, or 500%. The microbe can be cultured in the presence of a limiting amount of the nutrient for a portion of the total culture period or for the entire period. In particular embodiments, the nutrient concentration is cycled between a limiting concentration and a non-limiting concentration at least twice during the total culture period. In addition and as shown in the Figures, certain fixed carbon feedstocks such as glycerol can be employed to increase the percentage of cell weight that is lipid compared to comparable quantities of other fixed carbon feedstocks.

[0148] To increase lipid yield, acetic acid can be employed in the feedstock for a lipid-producing microbe (*e.g.*, a microalgae). Acetic acid feeds directly into the point of metabolism that initiates fatty acid synthesis (*i.e.*, acetyl-CoA); thus, providing acetic acid in the culture can increase fatty acid production. Generally, in this embodiment, the microbe is cultured in the presence of a sufficient amount of acetic acid to increase microbial lipid yield,

and/or microbial fatty acid yield, specifically, over microbial lipid (*e.g.*, fatty acid) yield in the absence of acetic acid.

[0149] In another embodiment, lipid yield is increased by culturing a lipid-producing microbe (*e.g.*, microalgae) in the presence of one or more cofactor(s) for a lipid pathway enzyme (*e.g.*, a fatty acid synthetic enzyme). Generally, in this embodiment, the concentration of the cofactor(s) is sufficient to increase microbial lipid (*e.g.*, fatty acid) yield over microbial lipid yield in the absence of the cofactor(s). In a particular embodiment, the cofactor(s) is provided to the culture by including in the culture a microbe (*e.g.*, microalgae) containing an exogenous gene encoding the cofactor(s). Alternatively, cofactor(s) may be provided to a culture by including a microbe (*e.g.*, microalgae) containing an exogenous gene that encodes a protein that participates in the synthesis of the cofactor. In certain embodiments, suitable cofactors include any vitamin required by a lipid pathway enzyme, such as, for example, biotin or pantothenate. Genes encoding cofactors suitable for use in the invention or that participate in the synthesis of such cofactors are well known and can be introduced into microbes (*e.g.*, microalgae) using constructs and techniques known to those in the art.

[0150] Microalgal biomass with a high percentage of oil/lipid accumulation by dry weight has been generated using a variety of different methods of culture known in the art. Microalgal biomass with a higher percentage of accumulated oil/lipid is useful in accordance with the present invention. Li et al. describe *Chlorella vulgaris* cultures with up to 56.6% lipid by DCW in stationary cultures grown under autotrophic conditions (*i.e.*, photosynthetic growth conditions) using high iron concentrations (Li et al., *Bioresource Technology* 99(11):4717-22 (2008)). Rodolfi et al. describe *Nanochloropsis sp.* and *Chaetoceros calcitrans* cultures with 60% lipid DCW and 39.8% lipid DCW, respectively, grown in a photobioreactor under nitrogen starvation conditions (Rodolfi et al., *Biotechnology & Bioengineering* 102(1):100-112 (2008)). Solovchenko et al. describe *Parietochloris incise* cultures with approximately 30% lipid accumulation (DCW) when grown phototrophically and under low nitrogen conditions (Solovchenko et al., *Journal of Applied Phcology* 20:245-251 (2008)). *Chlorella protothecoides* can produce up to 55% lipid (DCW) grown under certain heterotrophic conditions with nitrogen starvation (Miao and Wu, *Bioresource Technology* 97:841-846 (2006)). Other *Chlorella* species including *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, and *Chlorella minutissima* have been described to have accumulated up to 63% oil (DCW) when grown in stirred tank bioreactors under low-nitrogen media

conditions (Illman et al., *Enzyme and Microbial Technology* 27:631-635 (2000)). Still higher percent lipid accumulation by DCW has been reported, including 70% lipid (DCW) accumulation in *Dumaliella tertiolecta* cultures grown in increased NaCl conditions (Takagi et al., *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(3): 223-226 (2006)) and 75% lipid accumulation in *Botryococcus braunii* cultures (Banerjee et al., *Critical Reviews in Biotechnology* 22(3): 245-279 (2002)). These and similar methods can be used for photosynthetic and heterotrophic growth of microalgae to produce oil.

[0151] Microalgal biomass generated by the culture methods described herein and useful in accordance with the present invention comprises at least 10% microalgal oil by dry weight. In some embodiments, the microalgal biomass comprises at least 15%, at least 25%, at least 35%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, or at least 60% microalgal oil by dry weight. In some embodiments, the microalgal biomass contains from 10-90% microalgal oil, from 25-75% microalgal oil, from 40-75% microalgal oil, or from 50-70% microalgal oil by dry weight.

[0152] In various embodiments, the microalgal biomass comprises at least 25% at least 26%, at least 27%, at least 28%, at least 29%, at least 30%, at least 31%, at least 32%, at least 33%, at least 34%, at least 35%, at least 36%, at least 37%, at least 38%, at least 38%, at least 40%, at least 41%, at least 42%, at least 43%, at least 44%, at least 45%, at least 46%, at least 47%, at least 48%, at least 49%, or at least 50% microalgal oil by dry weight. In other embodiments, the microalgal biomass comprises at least 51%, at least 52%, at least 53%, at least 54%, at least 55%, at least 56%, at least 57%, at least 58%, at least 59%, at least 60%, at least 61%, at least 62%, at least 63%, at least 64%, at least 65%, at least 66%, at least 67%, at least 68%, at least 69%, at least 70%, at least 71%, at least 72%, at least 73%, at least 74%, at least 75%, at least 76%, at least 77%, at least 78%, at least 79%, at least 80%, at least 81%, at least 82%, at least 83%, at least 84%, at least 85%, at least 86%, at least 87%, at least 88%, at least 89%, or at least 90% microalgal oil by dry weight.

a. Use of Non-Traditional Carbon Sources

[0153] Microorganism can naturally grow on, or engineered to grow on, non-traditional carbon sources, such as sucrose, xylose, cellulosic materials, sorghum syrup and waste materials. Suitable cellulosic materials include residues from herbaceous and woody energy crops, as well as agricultural crops, i.e., the plant parts, primarily stalks and leaves, that are not the primary food or fiber product. Examples include agricultural wastes such as sugarcane bagasse, rice hulls, corn fiber (including stalks, leaves, husks, and cobs), wheat straw, rice

straw, sugar beet pulp, citrus pulp, citrus peels; forestry wastes such as hardwood and softwood thinnings, and hardwood and softwood residues from timber operations; wood wastes such as saw mill waste (wood chips, sawdust) and pulp mill waste; urban wastes such as paper fractions of municipal solid waste, urban wood waste, and urban green waste such as municipal grass clippings; and wood construction waste. Additional cellulosics include dedicated cellulosic crops such as switchgrass, hybrid poplar wood, and miscanthus, fiber cane, and fiber sorghum. Five-carbon sugars that are produced from such materials include xylose.

[0154] In another heterotrophic growth method, microalgal species can utilize mixed carbon sources such as sorghum syrup or pure sorghum. Sorghum syrup is produced from the juice of sweet sorghum cane. Its sugar profile consists of mainly glucose (dextrose), fructose, and sucrose. Microalgal strains can be screened for the capability to utilize sorghum as the sole carbon source. As non-limiting examples, microalgae from several strains of *Chlorella protothecoides, Chlorella luteovirdis, Prototheca moriformis, Chlorella kessleri, Parachlorella kessleri,* and *Prototheca stagnora* can utilize sorghum syrup in heterotrophic conditions, as described in the Examples below.

[0155] Some microorganisms naturally grow on or can be engineered to grow on a fixed carbon source that is a heterogeneous source of compounds, such as municipal waste, secondarily treated sewage, wastewater, and other sources of fixed carbon and other nutrients such as sulfates, phosphates, and nitrates. The sewage component serves as a nutrient source in the production of lipids, and the culture provides an inexpensive source of lipids for in situ transesterification and the production of biodiesel or for other chemical modification in accordance with the methods of the invention.

[0156] To reduce the cost of producing biodiesel or other chemically-modified lipids, crude, partially purified, or purified glycerol produced as a byproduct of lipid transesterification can be employed as a feedstock for fermenting, for example, lipid-producing microbial cultures. Thus, the invention provides methods involving the steps of culturing a microbe (*e.g.*, a microalgae) in a first microbial culture; subjecting the microbial biomass to transesterification to produce fatty acid ester(s) and glycerol, as described below; and adding the glycerol to a second microbial culture as a feedstock. The first and second microbial cultures can, but need not, be cultures of the same microbe. If desired, a continuous system can be implemented in accordance with the invention whereby glycerol produced from the lipid recovered from a culture can be fed back into the same culture.

[0157] Improved culture parameters incorporating the use of glycerol for fermentation of multiple genera of both eukaryotic and prokaryotic microbes, including microbes of the genera *Chlorella, Navicula, Scenedesmus, and Spirulina*, are described herein. As the examples demonstrate, microbes of extremely divergent evolutionary lineage, including *Chlorella, Navicula, Scenedesmus, and Spirulina* as well as cultures of multiple distinct *Chlorella* species grow very well on not only purified reagent-grade glycerol, but also acidulated and non-acidulated glycerol byproduct from biodiesel transesterification. In some instances microalgae, such as *Chlorella* strains, undergo cell division faster in the presence of glycerol than in the presence of glucose.

[0158] The methods of the present invention can utilize microorganisms, for example, cultured via two-stage growth processes in which cells are first fed glycerol to increase cell density rapidly, and are then fed glucose to accumulate lipids. This can provide significant economic benefits in that the glycerol byproduct of the transesterification process is put back into the production process. Other feeding methods are provided as well, such as methods in which mixtures of glycerol and glucose are fed, and methods in which glucose is fed during the growth phase and glycerol is fed during the lipid production phase. Feeding such mixtures can provide economic benefit. In addition, the methods of the invention include methods in which microorganisms are fed alternative sugars such as sucrose in various combinations with glycerol. These alternatives have been demonstrated with microbes from extremely divergent evolutionary lineage, including both prokaryotes and eukaryotes, demonstrating the feasibility of these alternative culture conditions for microbial fermentation in accordance with the methods of the present invention.

[0159] Multiple *Chlorella* species, and multiple strains within a species of *Chlorella*, perform better in the presence of glycerol byproduct from transesterification than in an equivalent amount of reagent grade glycerol. Glycerol byproduct from transesterification usually contains residual methanol and other contaminants in addition to glycerol. For example, Figures 1-6 demonstrate that strains of *Chlorella protothecoides* and *Chlorella kessleri* exhibit better productivity on acidulated and non-acidulated glycerol byproduct from biodiesel transesterification than when grown on pure reagent grade glycerol. Other microbes, such as *Scenedesmus* and *Navicula* microalgae, can also perform better in the presence of glycerol byproduct from transesterification than in an equivalent amount of reagent grade glycerol.

[0160] Figure 1 demonstrates that dry cell weight per liter (DCW per L) was higher on biodiesel glycerol byproduct than on pure glycerol, and this trend held true when the cells were grown in glycerol by itself or in combination with glucose. Figure 2 shows the same trends with additional strains of *Chlorella*. Figure 12(b) demonstrates that DCW per L of *Scenedesmus armatus* is higher on acidulated and non-acidulated biodiesel byproducts glycerol than on pure reagent grade glycerol. Figure 13 demonstrates that DCW per L of *Navicula pelliculosa* is higher on non-acidulated biodiesel byproduct glycerol than on pure reagent grade glycerol.

[0161] Figures 3 and 4 demonstrate that, with multiple species of *Chlorella* and multiple strains within a species of *Chlorella*, lipid levels (or lipid content) per liter are higher when the cells are cultured in the presence of biodiesel glycerol byproduct than when cultured in the presence of equivalent concentrations of pure reagent grade glycerol.

[0162] Figures 5 and 6 demonstrate that multiple species of *Chlorella* and multiple strains within a species of *Chlorella* accumulate a higher percentage of DCW as lipid (Lipid as a Percentage of Cell Weight) when cultured in the presence of biodiesel glycerol byproduct than when cultured in the presence of equivalent concentrations of pure reagent grade glycerol. Figure 11 demonstrates that both *Spirulina platensis* and *Navicula pelliculosa* can accumulate a higher percentage of DCW as lipid when cultured in the presence of biodiesel glycerol byproduct than when cultured in the presence of equivalent concentrations of pure reagent grade glycerol. Figure 12(a) demonstrates that *Scenedesmus armatus* can accumulate a higher percentage of DCW as lipid when cultured in the presence of biodiesel glycerol byproduct than when cultured in the presence of equivalent concentrations of pure reagent grade glycerol.

[0163] Moreover, multiple species of microbes, including microalgae such as *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Navicula*, and *Spirulina* exhibit better characteristics as biodiesel producers in the presence of mixtures of glycerol and glucose than in the presence of only glucose. Thus, Figure 7 demonstrates that *Chlorella* can accumulate higher lipid levels (content) per liter of culture in the presence of 1% glycerol/1% glucose than in the presence of 2% glucose. Figure 12(b) demonstrates that DCW per L of *Scenedesmus armatus* is higher when cultured in the presence of 1% biodiesel byproduct glycerol/1% glucose than in the presence of 2% glucose. Figure 13 demonstrates that DCW per L of *Navicula pelliculosa* is higher when cultured in the presence of 1% biodiesel byproduct glycerol/1% glucose than in the presence of 2% glucose.

[0164] Figure 8 demonstrates that *Chlorella* can accumulate a higher percentage of DCW as lipid when cultured in the presence of an equal concentration (weight percent) mixture of glycerol and glucose than when cultured in the presence of only glucose. Figure 11(a) demonstrates that *Spirulina platensis* can accumulate a higher percentage of DCW as lipid when cultured in the presence of an equal concentration (weight percent) mixture of biodiesel byproduct glycerol and glucose than when cultured in the presence of only glucose. Figure 11(b) demonstrates that *Navicula pelliculosa* can accumulate a higher percentage of DCW as lipid when cultured in the presence of an equal concentration (weight percent) mixture of reagent grade glycerol and glucose, as well as biodiesel byproduct glycerol and glucose, than when cultured in the presence of only glucose. Figure 12(b) demonstrates that *Scenedesmus armatus* can accumulate a higher percentage of DCW as lipid when cultured in the presence of an equal concentration (weight percent) mixture of biodiesel byproduct glycerol and glucose than when cultured in the presence of only glucose. Such methods of increasing the lipid as a percentage of DCW are useful in generating biomass that yields a lower amount of heteroatoms in biodiesel than lower percentage lipid biomass when the biomass is subjected to direct transesterification.

[0165] It has further been discovered that, by adding glycerol and glucose to microbes, including microalgae such as *Chlorella*, *Scenedesmus*, and *Navicula* sequentially, rather than as a single batch mixture of glycerol and glucose, can generate additional yield gains. This attribute of multiple species of *Chlorella* and multiple strains within a species of *Chlorella* was tested in the presence of both biodiesel glycerol byproduct and reagent grade glycerol.

[0166] Thus, Figure 8 demonstrates that *Chlorella* can accumulate a higher percentage of DCW as lipid when glycerol is added to a culture for a first period of time, followed by addition of glucose and continued culturing for a second period of time, than when the same quantities of glycerol and glucose are added together at the beginning of the experiment. Such methods of increasing the lipid as a percentage of DCW are useful in generating biomass that yields a lower amount of heteroatoms in biodiesel or other products than lower percentage lipid biomass when the biomass is subjected to direct transesterification or other methods of chemical modification. Figure 9 shows *Chlorella* exhibit higher lipid levels (content) per liter of culture when glycerol and glucose are added sequentially than when the same quantities of glycerol and glucose are added together at the beginning of the culture. This trend was observed when acidulated biodiesel byproduct glycerol, non-acidulated biodiesel byproduct glycerol, or reagent grade glycerol was used.

[0167] Figure 10 demonstrates four different strains of *Chlorella* of two different species accumulating higher DCW per L of culture when glycerol and glucose are added sequentially than when the same quantities of glycerol and glucose are added together at the beginning of the experiment. This trend was observed when acidulated biodiesel byproduct glycerol, non-acidulated biodiesel byproduct glycerol, or reagent grade glycerol was used. Figure 14(a) and (b) demonstrate that both *Scenedesmus armatus* and *Navicula pelliculosa* can exhibit increases in DCW per L when biodiesel byproduct glycerol only is added to a culture for a first period of time, followed later by addition of glucose, compared to adding identical amounts of glycerol and glucose at the beginning of the fermentation.

[0168] Thus, three different markers of productivity (DCW per L, grams per L of lipid, and percentage of DCW as lipid) in microbial lipid production are improved by the use of biodiesel byproduct and temporal separation of carbon sources.

[0169] The cost of producing biodiesel or other chemically-modified lipids can also be reduced by using cellulosic biomass as a feedstock. Cellulosic biomass (*e.g.*, stover, such as corn stover) is inexpensive and readily available; however, attempts to use this material as a feedstock for yeast have failed. In particular, such feedstocks have been found to be inhibitory to yeast growth, and yeast cannot use the 5-carbon sugars produced from cellulosic materials (*e.g.*, xylose from hemi-cellulose). By contrast, microalgae can grow on processed cellulosic material. Accordingly, the invention provides a method of culturing a microalgae in the presence of a cellulosic material and/or a 5-carbon sugar for the production of lipids that can be transesterified according to the methods described herein. Cellulosic materials generally include cellulose (40-60% dry weight); hemicellulose (20-40% dry weight); and lignin (10-30% dry weight).

[0170] Surprisingly, *Chlorella protothecoides* can exhibit higher levels of productivity when cultured on a combination of glucose and xylose than when cultured on either glucose or xylose alone. This synergistic effect provides a significant advantage in that it allows cultivation of *Chlorella* on combinations of xylose and glucose, such as cellulosic material, as shown in Figure 15.

[0171] The specific examples of process conditions to increase the yield of lipids suitable for use as biodiesel and/or to reduce production cost can be used individually, as described above, or in combination. In addition, the invention includes the selection and/or genetic engineering of microbes, such as microalgae, to produce microbes that are even more suitable for use in the above-described methods. For example, the use of microbes having a greater

ability to utilize any of the above-described feedstocks for increased proliferation and/or lipid production are within the scope of the methods of the invention.

[0172] The cost of producing biodiesel or other chemically-modified lipids can also be reduced by using sucrose as a feedstock, including sucrose produced, for example, from sugar cane. The methods of the invention include the use of engineered species of *Chlorella* that can utilize sucrose as a carbon source. For example, expression of a sucrose transporter and a sucrose invertase allows *Chlorella* to transport sucrose into the cell from the culture media and hydrolyze sucrose to yield glucose and fructose. Optionally, a fructokinase can be expressed as well in instances where endogenous hexokinase activity is insufficient for maximum phosphorylation of fructose. Examples of suitable sucrose transporters include those described under Genbank accession numbers CAD91334, CAB92307, and CAA53390. Examples of suitable sucrose invertases include those described under Genbank accession numbers CAB95010, NP_012104 and CAA06839. Examples of suitable fructokinases include those described under Genbank accession numbers P26984, P26420 and CAA43322. Vectors for transformation of microalgae, including *Chlorella*, encoding one or more of such genes can be designed as described in, for example, international publication number WO2008/151149.

[0173] Secretion of a sucrose invertase can obviate the need for expression of a transporter that can transport sucrose into the cell. This is because a secreted invertase catalyzes the conversion of a molecule of sucrose into a molecule of glucose and a molecule of fructose, both of which can be transported and utilized by microbes disclosed herein. Expression of a sucrose invertase with a secretion signal generates invertase activity outside the cell. See Hawkins et al., *Current Microbiology* Vol. 38 (1999), pp. 335–341, for examples of secretion signals active in *Chlorella*. Expression of such a protein allows cells already capable of utilizing extracellular glucose as an energy source to utilize sucrose as an extracellular energy source. In cells such as *Chlorella protothecoides*, which as demonstrated herein can use both extracellular fructose and extracellular glucose as an energy source, secretion of an invertase can provide the sole catalytic activity necessary for use of sucrose as an efficient, inexpensive energy source.

[0174] The growth potential of microorganisms expressing an exogenous secretable sucrose invertase is illustrated by the addition of an invertase to the culture medium of *Chlorella protothecoides*. Addition of the invertase permits cells to be fermented on a sugar source containing lignin (*e.g.*, molasses). Algae or other microorganisms can be engineered

as described herein to grow as well on molasses as they do on pure glucose, and the use of this low-value waste product of sugar cane processing can provide significant cost savings in the production of hydrocarbons. Figures 19-20 show the growth of cells on three sources of molasses (designated BS1, BS2 and HTM), as compared to growth on glucose or sucrose in the presence or absence of an extracellular sucrose invertase.

[0175] A sucrose invertase can also be expressed intracellularly in cells that express a sucrose transporter, as well as in cells that express any carbohydrate transporter that allows sucrose to enter the cell.

B. Lipid Pathway Engineering

[0176] As described herein, microorganisms useful in accordance with the methods of the present invention can optionally be engineered to express particular genes that can be beneficial in culturing the microorganisms (*e.g.*, expression of a sucrose invertase gene to facilitate the utilization of a sucrose feedstock) or in performing the direct chemical modification methods of the invention (*e.g.*, expression of a lytic gene to facilitate biomass disruption, and/or expression of a lipase gene to catalyze transesterification). In addition, optional genetic engineering can be used advantageously to engineer a microorganism's lipid pathway. This pathway can be modified to alter the properties and/or proportions of lipids produced and/or to increase carbon flux into lipids.

1. **Alteration of Properties and/or Proportions of Lipids Produced**

[0177] In the case of microalgae, some wild-type cells already have good growth characteristics but do not produce the desired types or quantities of lipids. Examples include *Pyrobotrys, Phormidium, Agmenellum, Carteria, Lepocinclis, Pyrobotrys, Nitzschia, Lepocinclis, Anabaena, Euglena, Spirogyra, Chlorococcum, Tetraedron, Oscillatoria, Phagus*, and *Chlorogonium*, which have the desirable growth characteristic of growing in municipal sewage or wastewater. Such cells can be engineered to have improved lipid production characteristics. Desired characteristics include optimizing lipid yield per unit volume and/or per unit time, carbon chain length (*e.g.*, for biodiesel production or for industrial applications requiring hydrocarbon feedstock), reducing the number of double or triple bonds, optionally to zero, removing or eliminating rings and cyclic structures, and increasing the hydrogen:carbon ratio of a particular species of lipid or of a population of distinct lipids. In addition, microalgae that produce desirable lipids can also be engineered to have even more advantageous outputs. Examples of such microalgae include species of the genus *Chlorella*.

[0178] In particular embodiments, one or more key enzymes that control branch points in metabolism to fatty acid synthesis can be up-regulated or down-regulated to improve lipid production. Up-regulation can be achieved, for example, by transforming cells with expression constructs in which a gene encoding the enzyme of interest is expressed, *e.g.*, using a strong promoter and/or enhancer elements that increase transcription. Such constructs can include a selectable marker such that the transformants can be subjected to selection, which can result in amplification of the construct and an increase in the expression level of the encoded enzyme. Examples of enzymes suitable for up-regulation according to the methods of the invention include pyruvate dehydrogenase, which plays a role in converting pyruvate to acetyl-CoA (examples, some from microalgae, include those described under Genbank accession numbers NP_415392; AAA53047; Q1XDM1; and CAF05587). Up-regulation of pyruvate dehydrogenase can increase production of acetyl-CoA, and thereby increase fatty acid synthesis. Acetyl-CoA carboxylase catalyzes the initial step in fatty acid synthesis. Accordingly, this enzyme can be up-regulated to increase production of fatty acids (examples, some from microalgae, include those described under Genbank accession numbers BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP_537052; YP_536879; NP_045833; and BAA57908). Fatty acid production can also be increased by up-regulation of acyl carrier protein (ACP), which carries the growing acyl chains during fatty acid synthesis (examples, some from microalgae, include those described under Genbank accession numbers A0T0F8; P51280; NP_849041; YP_874433) . Glycerol-3-phosphate acyltransferase catalyzes the rate-limiting step of fatty acid synthesis. Up-regulation of this enzyme can increase fatty acid production (examples, some from microalgae, include those described under Genbank accession numbers AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857; and ABO94442). The preceding proteins are candidates for expression in microalge, including species of the genus *Chlorella*.

[0179] Down-regulation of an enzyme of interest can achieved using, *e.g.*, antisense, catalytic RNA/DNA, RNA interference (RNA_i), "knock-out," "knock-down," or other mutagenesis techniques. Enzyme expression/function can also be inhibited using intrabodies. Examples of enzymes suitable for down-regulation according to the methods of the invention include citrate synthase, which consumes acetyl-CoA as part of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Down-regulation of citrate synthase can force more acetyl-CoA into the fatty acid synthetic pathway.

[0180] Global regulators modulate the expression of the genes of the fatty acid biosynthetic pathways. Accordingly, one or more global regulators of fatty acid synthesis can be up- or down-regulated, as appropriate, to inhibit or enhance, respectively, the expression of a plurality of fatty acid synthetic genes and, ultimately, to increase lipid production. Examples include sterol regulatory element binding proteins (SREBPs), such as SREBP-1a and SREBP-1c (for examples, see Genbank those described under accession numbers NP_035610 and Q9WTN3). Global regulators can be up- or down-regulated, as described above with respect to regulation of control point enzymes.

[0181] The methods of the invention can also be practiced using microbes (*e.g.*, microalgae, oleaginous yeast, bacteri or fungi) that have been genetically engineered to express one or more exogenous genes encoding lipid pathway enzymes such as, for example, a fatty acyl-ACP thioesterase (see examples in Table 4 with accession numbers) or an acyl carrier protein (ACP), which can failitate the cleavage of fatty acids having desirable carbon chain lengths from the acyl carrier protein during lipid synthesis. The fatty acyl-ACP thioesterase can be chosen based on its specificity for a fatty acid having a particular carbon chain length. In some embodiments, the fatty acyl-ACP thioesterase can be expressed from a gene operably linked to an inducible promoter, and/or can be expressed in an intracellular compartment. In some embodiments, genes encoding a fatty acyl-ACP thioesterase and a naturally co-expressed ACP may be transformed into a cell, optionally with one or more genes encoding other lipid pathway enzymes, as described above. In other embodiments, the ACP and the fatty acyl-ACP thioesterase may have an affinity for one another that imparts an advantage when the two are used together in the microbes and methods of the present invention, irrespective of whether they are or are not naturally co-expressed in a particular tissue or organism. Thus, the methods of the present invention can be practiced with cells expressing both naturally co-expressed pairs of such enzymes as well as with pairs that share an affinity for interacting with one another to facilitate cleavage of a length-specific carbon chain from the ACP.

[0182] Examples of further modifications suitable for use in the present invention are described in now abandoned U.S. Provisional Application No. 60/837,839, filed 15 Aug 06, and U.S. Patent Application No. 11/893,364, filed 15 Aug 07, each of which is incorporated herein by reference. This application discloses genetically engineering strains of microalgae to express two or more exogenous genes, one encoding a transporter of a fixed carbon source (such as sucrose) and a second encoding a sucrose invertase enzyme. The resulting

fermentable organisms produce lipids at lower manufacturing cost than what has been obtainable by previously known methods of production. This co-pending application also teaches that the insertion of the two exogenous genes described above can be combined with the disruption of polysaccharide biosynthesis through directed and/or random mutagenesis, which steers ever greater carbon flux into lipid production. Individually and in combination, trophic conversion, engineering to alter lipid production and treatment with exogenous enzymes alter the lipid composition produced by a microorganism. The alteration can be a change in the amount of lipids produced, the amount of one or more lipid species produced relative to other lipids, and/or the types of lipid species produced in the microorganism. For example, microalgae can be engineered to produce a higher amount and/or percentage of TAGs, or TAGs with higher proportions of particular carbon length fatty acid molecules.

[0183] Fatty acyl-ACP thioesterases suitable for use with the microbes and methods of the invention include, without limitation, those listed in Table 4.

[0184] Table 4. Fatty acyl-ACP thioesterases and GenBank accession numbers.

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

Gossypium hirsutum fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAD01982)
Vitis vinifera fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #CAN81819)
Garcinia mangostana fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAB51525)
Brassica juncea fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #ABI18986)
Madhuca longifolia fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAX51637)
Brassica napus fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #ABH11710)
Oryza sativa (indica cultivar-group) fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #EAY86877)
Oryza sativa (japonica cultivar-group) fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #NP_001068400)
Oryza sativa (indica cultivar-group) fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #EAY99617)
Cuphea hookeriana fatty acyl-ACP thioesterase (GenBank #AAC49269)

[0185] Other suitable enzymes for use with the microbes and the methods of the invention include those that have at least 70% amino acid identity with one of the proteins listed in Table 4, and that exhibit the corresponding desired enzymatic activity (*i.e.*, cleavage of a fatty acid from an acyl carrier protein. In additional embodiments, the enzymatic activity is present in a sequence that has at least about 75%, at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 99% identity with one of the above described sequences, all of which are hereby incorporated by reference.

[0186] The lipid pathway enzymes described above are useful in the production of various lipids from a microbe (*e.g.*, a microalgae, an oleaginous yeast, or a fungus) or population of microbes, whereby a fatty acyl-ACP thioesterase cleaves a fatty acid from an acyl carrier protein (ACP) during lipid synthesis. These lipid pathway enzymes can have a specificity for acting on a substrate which includes a specific number of carbon atoms. For example, a fatty acyl-ACP thioesterase may have a specificity for cleaving a fatty acid having 16 carbon atoms from the ACP. Therefore, in various embodiments, the microbe can contain an exogenous gene that encodes a protein with specificity for catalyzing an enzymatic activity (*e.g.*, cleavage of a fatty acid from an ACP) with regard to the number of carbon atoms contained in the substrate. The enzymatic specificity can, in various embodiments, be for a substrate having from 8 to 34 carbon atoms, preferably from 8 to 18 carbon atoms, and more preferably from 14 to 18 carbon atoms.

[0187] By selecting the desired combination of exogenous genes to be expressed, one can tailor the lipid components generated by the microbe. The microbe, when cultured as

described above, synthesizes a fatty acid linked to an ACP and the fatty acyl-ACP thioesterase catalyzes the cleavage of the fatty acid from the ACP to yield, through further enzymatic processing, a TAG incorporating the fatty acid molecule.

2. Increased Carbon Flux into Lipid Pathway

[0188] Some microalgae produce significant quantities of non-lipid metabolites, such as, for example, polysaccharides. Because polysaccharide biosynthesis can use a significant proportion of the total metabolic energy available to cells, mutagenesis of lipid-producing cells followed by screening for reduced or eliminated polysaccharide production generates strains that are capable of producing higher yields of lipids.

[0189] Examples of expression of transgenes in *Chlorella* can be found in the literature (*see*, for example, *Current Microbiology* Vol. 35 (1997), pp. 356–362; Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2000 Jul;16(4):443-6; *Current Microbiology* Vol. 38 (1999), pp. 335–341; *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 72: 197–205; *Marine Biotechnology* 4, 63–73, 2002; *Current Genetics* 39:5, 365-370 (2001); *Plant Cell Reports* 18:9, 778-780, (1999); *Biologia Plantarium* 42(2): 209-216, (1999); *Plant Pathol. J* 21(1): 13-20, (2005)). Any convenient technique for introducing a transgene into *Chorella* can be employed for purposes of the present invention.

[0190] Examples of expression of transgenes in oleaginous yeast (e.g., *Yarrowia lipolytica*) can be found in the literature (*see*, for example, Bordes et al., *J Microbiol Methods*, Jun 27 (2007)). Examples of expression of transgenes in fungi (*e.g.*, *Mortierella alpine*, *Mucor circinelloides*, and *Aspergillus ochraceus*) can also be found in the literature (*see*, for example, *Microbiology*, Jul; 153(Pt. 7):2013-25 (2007); *Mol Genet Genomics*, Jun; 271(5):595-602 (2004); *Curr Genet*, Mar;21(3):215-23 (1992); *Current Microbiology*, 30(2):83-86 (1995); Sakuradani, NISR Research Grant, "Studies of Metabolic Engineering of Useful Lipid-producing Microorganisms" (2004); and PCT/JP2004/012021). Examples of expression of exogenous genes in bacteria such as *E. coli* are well known; *see*, for example, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press.

IV. METHODS OF IN SITU TRANSESTERIFICATION

[0191] In situ transesterification of TAGs to fatty acid alkyl esters in accordance with the methods of the present invention can be performed on biomass generated from the microbial cultures described above. In some embodiments, the biomass may comprise biomass combined from two or more cultures of distinct strains or species of microorganisms. In some

embodiments, the distinct stains or species have different glycerolipid profiles, as illustrated in Examples 22 and 24.

[0192] In some methods of the invention, the microbial biomass is first harvested from the culture medium and dried, and then subjected to an optional biomass disruption process prior to transesterification. In other methods of the invention, the microbial biomass is subjected to a biomass disruption process prior to drying and transesterification. In some methods, harvesting the biomass comprises separating the cellular components of the biomass from the water and cell culture media by, for example, passing the contents of the cell culture bioreactor through a screen or similar filtering apparatus. In some embodiments, harvesting the biomass comprises processing the cellular components of the cell culture into a paste or low moisture-content composition.

A. Drying Methods

[0193] Drying the biomass generated from the cultured microorganisms described herein removes water that would otherwise be available as a substrate during the transesterification reaction, described in greater detail below, leading to the formation of free fatty acids, rather than the desired fatty acid alkyl esters. The extent to which biomass used in the in situ transesterification methods of the present invention must be dried depends on the alcohol:biomass ratio used in the transesterification process, the cost of the alcohol, and the cost or other volume constraints placed on the size of the reaction vessel in which the transesterfication is to be performed. As will be appreciated, these factors, balanced against the costs of drying the biomass, determine an "acceptable dryness" for the biomass.

[0194] In some embodiments, the biomass can be dried using a drum dryer in which the biomass is rotated in a drum and dried with the application of air, which may be heated to expedite the drying process. In other embodiments, an oven or spray dryer can be used to facilitate drying of the biomass. Alternatively, the biomass may be dried via a lyophilization process. The lyophilization process may summarily be described as a "freeze-drying" process, in which the biomass is frozen in a freeze-drying chamber. The application of a vacuum to the freeze-drying chamber results in sublimation (primary drying) and desorption (secondary drying) of the water from the biomass, resulting in a product suitable for further processing as described below. In still other embodiments a combination of the foregoing may be utilized to appropriately dry the biomass for further processing in accordance with the methods described herein.

B. Biomass Disruption Methods

[0195] In some embodiments it may be desirable to disrupt the biomass prior to in situ transesterification to make the intracellular contents of the microorganisms more readily accessible to the alcohol and catalyst transesterification reagents. This can help to facilitate the conversion of TAGs to fatty acid alkyl esters or other molecules in accordance with the methods of the invention.

[0196] In some methods of the invention, disruption of the biomass can be accomplished prior to subjecting the biomass to one or more of the drying processes described above. In other methods, disruption of the biomass can follow such a drying process. In some methods, water is removed from the biomass prior to or after disruption of the biomass, with or without subjecting the biomass to a drying process. Following growth, the microorganisms are optionally isolated by centrifuging the culture medium to generate a concentrated microbial biomass. Disruption of the biomass can be accomplished by lysing the microbial cells to produce a lysate. Cell lysis can be achieved by any convenient means including heat-induced lysis, addition of a base, addition of an acid, via the use of enzymes such as proteases or polysaccharide degradation enzymes such as amylases, via the use of ultrasound, mechanical lysis, via the use of osmotic shock, infection with a lytic virus, and/or expression of one or more lytic genes. Lysis is performed to release intracellular molecules which have been produced by the microorganism. Each of these methods for lysing a microorganism can be used as a single method or in combination.

[0197] The extent of cell disruption can be observed by microscopic analysis. Using one or more of the methods described herein, typically more than 70% cell breakage is observed. Preferably, cell breakage is more than 80%, more preferably more than 90% and most preferably about 100%.

[0198] In particular embodiments, the microorganism is lysed after growth, for example to increase the exposure of cellular lipid to a catalyst for transesterification such as a lipase or a chemical catalyst, expressed as described below. The timing of lipase expression (*e.g.*, via an inducible promoter), cell lysis, and the adjustment of transesterification reaction conditions (*e.g.*, removal of water, addition of alcohol, etc.) can be adjusted to optimize the yield of fatty acid esters from lipase-mediated transesterification.

[0199] In one embodiment of the present invention, the process of lysing a microorganism comprises heating a cellular suspension containing the microorganisms. In this embodiment, the culture medium containing the microorganisms (or a suspension of microorganisms isolated from the culture medium) is heated until the microorganisms, *i.e.*, the cell walls and

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

[0200] In another embodiment of the present invention, the process of lysing a microorganism comprises adding a base to a cellular suspension containing the microorganism. The base should be strong enough to hydrolyze at least a portion of the proteinaceous compounds of the microorganisms used. Bases which are useful for solubilizing proteins are known in the art of chemistry. Exemplary bases which are useful in these methods include, but are not limited to, hydroxides, carbonates and bicarbonates of lithium, sodium, potassium, calcium, and mixtures thereof. A preferred base is KOH. In another embodiment of the present invention, the process of lysing a microorganism comprises adding an acid to a cellular suspension containing the microorganism.

[0201] In another embodiment of the present invention, the process of lysing a microorganism comprises lysing the microorganism with an enzyme. Enzymes for lysing a microorganism include proteases and polysaccharide-degrading enzymes such as hemicellulase, pectinase, cellulase, and driselase. A polysaccharide-degrading enzyme, optionally from *Chlorella* or a *Chlorella* virus, is preferred. A preferred pair of enzymes for lysing oil bearing biomass are alcalase and mannaway (Novozymes).

[0202] In another embodiment of the present invention, the process of lysing a microorganism is performed using ultrasound, *i.e.*, sonication. Cells can also by lysed with high frequency sound. The sound can be produced electronically and transported through a metallic tip to an appropriately concentrated cellular suspension. This sonication (or ultrasonication) disrupts cellular integrity based on the creation of cavities in the cell suspension.

[0203] In another embodiment of the present invention, the process of lysing a microorganism is performed by mechanical means. Cells can be lysed mechanically and optionally homogenized to facilitate lipid transesterification. For example, a pressure disrupter can be used to pump a cell containing slurry through a restricted orifice valve. High pressure (up to 1500 bar) is applied, followed by an instant expansion through an exiting nozzle. Cell disruption is accomplished by three different mechanisms: impingement on the valve, high liquid shear in the orifice, and sudden pressure drop upon discharge, causing an explosion of the cell. The method releases intracellular molecules. Alternatively, a ball mill

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

[0204] In another embodiment of the present invention, the process of lysing a microorganism is performed by applying an osmotic shock.

[0205] In another embodiment of the present invention, the process of lysing a microorganism is performed by steam treatment, *i.e.*, through addition of pressurized steam. Steam treatment of microalgae for cell disruption is described, for example, in U.S. Patent No. 6,750,048.

[0206] In another embodiment of the present invention, the process of lysing a microorganism comprises infection of the microorganism with a lytic virus. A wide variety of viruses are known to lyse microorganisms suitable for use in the methods of the present invention, and the selection and use of a particular lytic virus for a particular microorganism is within the level of skill in the art. For example, *paramecium bursaria chlorella* virus (PBCV-1) is the prototype of a group (family Phycodnaviridae, genus Chlorovirus) of large, icosahedral, plaque-forming, double-stranded DNA viruses that replicate in, and lyse, certain unicellular, eukaryotic chlorella-like green algae. Accordingly, any susceptible microalgae, such as *C. protothecoides*, can be lysed by infecting the culture with a suitable chlorella virus. Methods of infecting species of *Chlorella* with a chlorella virus are known. See for example *Adv. Virus Res.* 2006;66:293-336; *Virology*, 1999 Apr 25;257(1):15-23; *Virology*, 2004 Jan 5;318(1):214-23; *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2000;(44):161-2; *J. Virol.* 2006 Mar;80(5):2437-44; and *Annu. Rev. Microbiol.* 1999;53:447-94.

[0207] In another emboidment of the present invention, the process of lysing a microorganism comprises autolysis. In this embodiment, a microorganism useful in the methods of the invention is genetically engineered to produce a lytic gene that will lyse the microorganism. This lytic gene can be expressed using an inducible promoter, so that the cells can first be grown to a desirable density in a culture medium and then harvested, followed by induction of the promoter to express the lytic gene to lyse the cells. In one embodiment, the lytic gene encodes a polysaccharide-degrading enzyme. In certain other embodiments, the lytic gene is a gene from a lytic virus. Thus, for example, a lytic gene from a Chlorella virus can be expressed in a *Chlorella* such as *C. protothecoides*.

[0208] Expression of lytic genes is preferably done using an inducible promoter, such as a promoter active in microalgae that is induced by a stimulus such as the presence of a small molecule, light, heat, and other stimuli. Lytic genes from chlorella viruses are known. For example, see *Virology* 260, 308-315 (1999); *FEMS Microbiology Letters* 180 (1999) 45-53; *Virology* 263, 376-387 (1999); and *Virology* 230, 361–368 (1997).

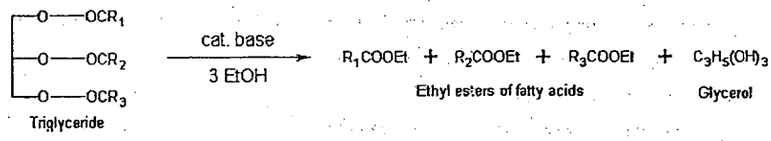
[0209] In particular embodiments, the microoganisms are lysed after growth, for example to increase the exposure of cellular lipid to a catalyst for transesterification such as a lipase, discussed below, or a chemical catalyst. The timing of lipase expression (*e.g.*, via an inducible promoter), cell lysis, and the modification of transesterification reaction conditions (*e.g.*, removal of water, addition of alcohol, etc.) can be adjusted to optimize the yield of fatty acid esters from lipase-mediated transesterification.

C. Transesterification

[0210] Lipids produced by microorganisms as described above are subjected to a process of transesterification in accordance with the methods of the invention to generate a lipophilic phase containing fatty acid alkyl esters and a hydrophilic phase comprising cell material and glycerol. In some methods of the invention, the lipophilic phase is then separated from the hydrophilic cell material.

1. General Chemical Process

[0211] Animal and plant oils are typically made of triacylglycerols (TAGs), which are esters of free fatty acids with the trihydric alcohol, glycerol. In transesterification, the glycerol in a TAG is replaced with a lower alkyl alcohol such as methanol, ethanol or isopropanol. A typical reaction scheme is as follows:



[0212] In this scheme, the alcohol is deprotonated with a base to make it a stronger nucleophile. Commonly, ethanol or methanol is used in vast excess (up to 50-fold). Normally, this reaction will proceed either exceedingly slowly or not at all. Heat, as well as an acid or base, can be used to help speed the reaction. The acid or base is not consumed by the transesterification reaction; thus, they are not reactants but catalysts. Almost all biodiesel has traditionally been produced using the base-catalyzed technique, as it requires only low

temperatures and pressures and produces over 98% conversion yield (provided the starting oil is low in moisture and free fatty acids).

[0213] A special case of transesterification is glycerolysis or the the use of glycerol(glycerin) to break chemical bonds. The glycerolysis reaction is usually catalyzed by the addition of an acid or a base. Glycerolysis can be performed on simple esters, fats, free fatty acids or TAGs, wherein the methyl esters react with excess glycerol to form mono- and/or diglycerides, producing methanol as a by-product. Mono- and diglycerides are useful as emulsifiers and are commonly added to food products.

2. Using Recombinant Lipases for Transesterification

[0214] Transesterification has also been carried out experimentally using an enzyme, such as a lipase, instead of a base. Lipase-catalyzed transesterification can be carried out, for example, at a temperature between the room temperature and 80° C, and a molar ratio of the TAG to the lower alcohol of greater than 1:1, preferably about 3:1. Lipases suitable for use in transesterification in accordance with the methods of the present invention include, but are not limited to, those listed in Table 5. Other examples of lipases useful for transesterification are found in, *e.g.* U.S. Patent Nos. 4,798,793; 4,940,845 5,156,963; 5,342,768; 5,776,741 and WO89/01032, each of which is incorporated herein by reference.

[0215] Table 5. Lipases for use in transesterification.

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

[0216] One challenge to using a lipase for the production of fatty acid esters suitable for biodiesel is that the price of lipase is much higher than the price of sodium hydroxide (NaOH) used by the strong base process. This challenge has been addressed by using an immobilized lipase, which can be recycled. However, the activity of the immobilized lipase must be maintained after being recycled for a minimum number of cycles to allow a lipase-

based process to compete with the strong base process in terms of the production cost. Immobilized lipases are subject to poisoning by the lower alcohols typically used in transesterification. U.S. Patent No. 6,398,707 (issued June 4, 2002 to Wu et al.), incorporated herein by reference, describes methods for enhancing the activity of immobilized lipases and regenerating immobilized lipases having reduced activity.

[0217] In particular embodiments, a recombinant lipase is expressed in the same microorganisms that produce the lipid on which the lipase acts. Suitable recombinant lipases include those listed above in Table 5 and/or those described under the GenBank Accession numbers listed above in Table 5, or a polypeptide that has at least 70% amino acid identity with one of the lipases listed above in Table 5 and that exhibits lipase activity. In additional embodiments, the enzymatic activity is present in a sequence that has at least about 75%, at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 99% identity with one of the above described sequences, all of which are hereby incorporated by reference.

[0218] An exemplary vector design for expression of a lipase gene in a microorganism such as a microalgae contains a gene encoding a lipase in operable linkage with a promoter active in microalgae. Alternatively, if the vector does not contain a promoter in operable linkage with the lipase gene, the lipase gene can be transformed into the cells such that it becomes operably linked to an endogenous promoter at the point of vector integration. The promoterless method of transformation has been demonstrated in microalgae (*see*, for example, *Plant Journal* 14:4, (1998), pp.441-447). The vector can also contain a second gene that encodes a protein that imparts resistance to an antibiotic or herbicide, *i.e.*, a selectable marker. Optionally, one or both gene(s) is/are followed by a 3' untranslated sequence containing a polyadenylation signal. Expression cassettes encoding the two genes can be physically linked in the vector or on separate vectors. Co-transformation of microalgae can also be used, in which distinct vector molecules are simultaneously used to transform cells (*see*, for example, *Protist* 2004 Dec;155(4):381-93). The transformed cells can be optionally selected based upon the ability to grow in the presence of the antibiotic or other selectable marker under conditions in which cells lacking the resistance cassette would not grow.

[0219] DNA encoding the lipase and selectable marker can be codon-optimized cDNA. Methods of recoding genes for expression in microalgae are described in US Patent 7,135,290. Additional information is available at the web address www.kazusa.or.jp/codon.

[0220] Many promoters are active in microalgae, including promoters that are endogenous to the algae being transformed, as well as promoters that are not endogenous to the algae being transformed (i.e., promoters from other algae, promoters from higher plants, and promoters from plant viruses or algae viruses). Exogenous and/or endogenous promoters that are active in microalgae, and antibiotic resistance genes functional in microalgae are known in the art. The promoter used to express an exogenous gene can be the promoter naturally linked to that gene or can be a heterologous gene. Some promoters are active in more than one species of microalgae. Other promoters are species-specific. Preferred promoters include promoters such as RBCS2 from *Chlamydomonas reinhardtii* and viral promoters, such as cauliflower mosaic virus (CMV) and chlorella virus, which have been shown to be active in multiple species of microalgae (*see*, for example, *Plant Cell Rep.* 2005 Mar;23(10-11):727-35; *J Microbiol.* 2005 Aug;43(4):361-5; *Mar Biotechnol* (NY). 2002 Jan;4(1):63-73).

[0221] Promoters, cDNAs, and 3'UTRs, as well as other elements of the vectors, can be generated through cloning techniques using fragments isolated from native sources (*see*, for example, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press, and U.S. Patent 4,683,202). Alternatively, elements can be generated synthetically using known methods (*see*, for example, *Gene* 1995 Oct 16;164(1):49-53).

[0222] Cells can be transformed by any suitable technique including, *e.g.*, biolistics, electroporation, glass bead transformation and silicon carbide whisker transformation.

[0223] In particular embodiments, the lipase is expressed in an inducible and/or targeted manner. The use of an inducible promoter to express a lipase gene permits production of the lipase after growth of the microorganism when conditions have been adjusted, if necessary, to enhance transesterification, for example, after disruption of the cells, reduction of the water content of the reaction mixture, and/or addition sufficient alcohol to drive conversion of TAGs to fatty acid esters. Inducible promoters useful in the invention include those that mediate transcription of an operably linked gene in response to a stimulus, such as an exogenously provided small molecule, temperature (heat or cold), light, etc. Suitable promoters can activate transcription of an essentially silent gene or upregulate, preferably substantially, transcription of an operably linked gene that is transcribed at a low level. In the latter case, the level of transcription of the lipase preferably does not significantly interfere with the growth of the microorganism in which it is expressed.

[0224] It can be advantageous, in particular embodiments, to target expression of the lipase to one or more cellular compartments, where it is sequestered from the majority of cellular lipids until initiation of the transesterification reaction.

3. Advantages of Biomass with Higher Oil:Non-Oil Ratio

[0225] Direct transesterification of agricultural products has been performed as reported in US Patent Application Publication Nos. 20030229237 (published December 11, 2003) and 20050020842 (published January 27, 2005). These processes employ materials such as soy, coconut, palm, corn, cotton, flax, rapeseed/canola, safflower, sunflower or other seed-oil feedstocks or animal fats as the substrate for a transesterification process to produce fatty acid alkyl esters.

[0226] A particular advantage of using microorganisms, as described herein, for the generation of TAGs useful in the transesterification methods of the present invention, is the ability to modulate the ratio of oil to non-oil in the biomass, which has been unexpectedly found to impart two advantageous characteristics. First, as shown in the examples below, transesterification of biomass having a higher oil:non-oil ratio leads to an increased efficiency in the conversion of TAGs to fatty acid alkyl esters. Second, as also shown in the examples below, transesterification of biomass having a higher oil:non-oil ratio produces a biodiesel product with reduced proportions of undesirable heteroatoms. In the latter case, the lipophilic phase generated by the transesterification comprises phosphorous in an amount, by weight, no greater than 60 parts per million. In some embodiments, the amount of phosphorous by weight in the lipophilic phase is no greater than 25 parts per million. In some embodiments, the amount of phosphorous by weight in the lipophilic phase is no greater than 10 parts per million. In other embodiments, the amount of sulfur by weight in the lipophilic phase is no greater than 80 parts per million, and in still other embodiments, the amount of sulfur by weight in the lipophilic phase is no greater than 60 parts per million. In some embodiments, the amount of sulfur by weight in the lipophilic phase is no greater than 15 parts per million. In some embodiments, the amount of iron by weight in the lipophilic phase is no greater than 2 parts per million. In some embodiments, the amount of zinc by weight in the lipophilic phase is no greater than 40 parts per million. In some embodiments, the amount of zinc by weight in the lipophilic phase is no greater than 12 parts per million. In some embodiments, the combined amount of magnesium and calcium by weight in the lipophilic phase is no greater than 5 parts per million. In some embodiments, the combined amount of sodium and potassium by weight in the lipophilic phase is no greater than 50 parts per million. In some

embodiments, the combined amount of sodium and potassium by weight in the lipophilic phase is no greater than 15 parts per million. Some methods of the invention yield a product in which two or more of the following heteroatoms or combinations of heteroatoms are limited in concentration in the lipophilic phase of the transesterified material to the following concentrations: sulfur is less than 15 parts per million; phosphorous is less than 2 0.001% total mass; the combined amount of magnesium and calcium is no greater than 5 parts per million; and the combined amount of sodium and potassium is no greater than 15 parts per million.

[0227] Another aspect of high oil biomass grown heterotrophically, particularly microalgae, is the amount of carotenoids resulting in the lipophilic phase after transesterification. In some embodiments of the present invention, the amount of lutein is no greater than 400 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of lutein is no greater than 200 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of lutein is no greater than 100 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of lutein is no greater than 40 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of lutein is no less than 5 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of lutein is no less than 10 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of lutein is no less than 30 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the lipophilic phase contains an amount of lutein at between any combination of the maximum and minimum levels recited above, such as below 400 and at least 5 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of lutein is approximately 35 micrograms per gram of lipophilic phase.

[0228] In some embodiments, the amount of zeaxanthin is no greater than 275 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of zeaxanthin is no greater than 150 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of zeaxanthin is no greater than 75 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of zeaxanthin is no greater than 25 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of zeaxanthin is no less than 0.5 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of zeaxanthin is no less than 10 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of zeaxanthin is no less than 20 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the lipophilic phase contains an amount of zeaxanthin at between any

combination of the maximum and minimum levels recited above, such as below 275 and at least 0.5 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of zeaxanthin is approximately 23 micrograms per gram of lipophilic phase.

[0229] In some embodiments, the amount of α-Cryptoxanthin is no greater than 8 migrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Cryptoxanthin is no greater than 5 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Cryptoxanthin is no greater than 2 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Cryptoxanthin is no greater than 0.1 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Cryptoxanthin is no less than 0.001 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Cryptoxanthin is no less than 0.01 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Cryptoxanthin is no less than 0.05 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the lipophilic phase contains an amount of α-Cryptoxanthin at between any combination of the maximum and minimum levels recited above, such as below 8 and at least 0.01 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Cryptoxanthin is approximately 0.06 micrograms per gram of lipophilic phase.

[0230] In some embodiments, the amount of β-Cryptoxanthin is no greater than 18 migrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Cryptoxanthin is no greater than 8 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Cryptoxanthin is no greater than 4 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Cryptoxanthin is no greater than 2 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Cryptoxanthin is no less than 0.1 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Cryptoxanthin is no less than 1 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Cryptoxanthin is no less than 1.5 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the lipophilic phase contains an amount of β-Cryptoxanthin at between any combination of the maximum and minimum levels recited above, such as below 18 and at least 0.1 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Cryptoxanthin is approximately 1.8 micrograms per gram of lipophilic phase.

[0231] In some embodiments, the amount of α-Carotene is no greater than 1.9 migrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Carotene is no greater

than 1 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Carotene is no greater than 0.1 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Carotene is no greater than 0.09 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Carotene is no less than 0.0005 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Carotene is no less than 0.01 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Carotene is no less than 0.05 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the lipophilic phase contains an amount of α-Carotene at between any combination of the maximum and minimum levels recited above, such as below 1.9 and at least 0.0005 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of α-Carotene is approximately 0.08 micrograms per gram of lipophilic phase.

[0232] In some embodiments, the amount of β-Carotene is no greater than 14 migrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Carotene is no greater than 10 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Carotene is no greater than 4 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Carotene is no greater than 1.5 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Carotene is no less than 0.1 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Carotene is no less than 0.9 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Carotene is no less than 1 microgram per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the lipophilic phase contains an amount of β-Carotene at between any combination of the maximum and minimum levels recited above, such as below 14 and at least 0.1 micrograms per gram of lipophilic phase. In some embodiments, the amount of β-Carotene is approximately 1.2 micrograms per gram of lipophilic phase.

[0233] The increased efficiency with which TAGs are converted to fatty acid alkyl esters, and the reduced proportion of heteroatoms introduced into the lipophilic phase, via application of the methods of the present invention to biomass comprising a high oil:non-oil ratio are unexpected advantages. Examples showing the improved efficiency with which oil can be transesterified, and the reduced proportion of heteroatoms in the transesterified product, are described below.

[0234] In some embodiments, the oil:non-oil ratio of the dried biomass subjected to transesterification or other methods of chemical modification is at least 1:20, at least 1:19, at least 1:18, at least 1:17, at least 1:16, at least 1:15, at least 1:14, at least 1:13, at least 1:12, at

least 1:11, at least 1:10, at least 1:9, at least 1:8, at least 1:7, at least 1:6, at least 1:5, at least 1:4, at least 1:3, at least 1:2, or at least 1:1. In other embodiments, the oil:non-oil ratio of the dried biomass subjected to transesterification is at least 1.1:1, at least 1.2:1, at least 1.3:1, at least 1.4:1, at least 1.5:1, at least 1.6:1, at least 1.7:1, at least 1.8:1, at least 1.9:1, at least 2:1, at least 3:1, at least 4:1, at least 5:1, at least 6:1, at least 7:1, at least 8:1, at least 9:1, or at least 10:1.

V. OTHER METHODS OF CHEMICAL MODIFICATION OF LIPID-CONTAINING BIOMASS

[0235] The present invention provides methods of chemical modification other than transesterification that yield products useful in a variety of industrial and other applications, including hydrogenation, interesterification, hydroxylation, and hydrolysis plus derivatization. In a manner similar to that described above with reference to transesterification, these chemical modifications can also be performed on biomass generated from the microbial cultures described herein. In some embodiments, the biomass may comprise biomass combined from two or more cultures of distinct strains or species of microorganisms. In some embodiments, the distinct strains or species have different glycerolipid profiles, as illustrated in Example 22. In some methods of the invention, the microbial biomass is first harvested from the culture medium, and then subjected to a chemical reaction that covalently modifies at least 1% of the lipid. In some embodiments, at least 2%, at least 3%, at least 4%, at least 5%, at least 10%, at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, or at least 90% of the lipid is modified by the chemical process.

A. Hydrogenation: Saturation of Double Bonds

[0236] Hydrogenation is the addition of hydrogen to double bonds in the fatty acid constituents of glycerolipids or of free fatty acids. The hydrogenation process permits the transformation of liquid oils into semi-solid or solid fats, which may be more suitable for specific applications. Hydrogenation is a well-known chemical process, and generally comprises contacting an oil mixture with a finely divided transition metal (e.g., nickel, palladium, platinum, or rhodium) catalyst at an elevated temperature (e.g., 140-225°C) in the presence of hydrogen.

[0237] Hydrogenation of biomass produced by the methods described herein can be performed in conjunction with one or more of the methods and/or materials provided herein, including microbial biomass with a percentage of DCW as lipid at least 20%, or to produce

products, as reported in the following: US Patent Nos. 7,288,278 (food additives or medicaments); 5,346,724 (lubrication products); 5,475,160 (fatty alcohols); 5,091,116 (edible oils); 6,808,737 (structural fats for margarine and spreads); 5,298,637 (reduced-calorie fat substitutes); 6,391,815 (hydrogenation catalyst and sulfur adsorbent); 5,233,099 and 5,233,100 (fatty alcohols); 4,584,139 (hydrogenation catalysts); 6,057,375 (foam suppressing agents); and 7,118,773 (edible emulsion spreads), each of which is incorporated herein by reference.

B. **Interesterification: Interchanging Fatty Acid Components of Glycerolipids**

[0238] Naturally produced glycerolipids typically do not have a uniform distribution of fatty acid constituents. In the context of oils, interesterification refers to the exchange of acyl radicals between two esters of different glycerolipids. The interesterification process provides a mechanism by which the fatty acid constituents of a mixture of glycerolipids can be rearranged to modify the distribution pattern. Interesterification is a well-known chemical process, and generally comprises heating (to about 200°C) a mixture of oils for a period (e.g, 30 minutes) in the presence of a catalyst, such as an alkali metal or alkali metal alkylate (e.g., sodium methoxide). This process can be used to randomize the distribution pattern of the fatty acid constituents of an oil mixture, or can be directed to produce a desired distribution pattern. This method of chemical modification of lipids can be performed on materials provided herein, such as microbial biomass with a lipid percentage of DCW of at least 20%.

[0239] Directed interesterification, in which a specific distribution pattern of fatty acids is sought, can be performed by maintaining the oil mixture at a temperature below the melting point of some TAGs that might be present. This results in selective crystallization of these TAGs, which effectively removes them from the reaction mixture as they crystallize. The process can be continued until most of the fatty acids in the oil have precipitated. A directed interesterification process can be used to produce, for example, a product with a lower calorie content via the substitution of longer-chain fatty acids with shorter-chain counterparts. Directed interesterification can also be used to produce a product with a mixture of fats that can provide desired melting characteristics and structural features sought in food additives or food products (e.g., margarine) without resorting to hydrogenation, which can produce unwanted trans isomers.

[0240] Interesterification of biomass produced by the methods described herein can be performed in conjuction with one or more of the methods and/or materials, or to produce

products, as reported in the following: US Patent Nos. 6,080,853 (nondigestible fat substitutes); 4,288,378 (peanut butter stabilizer); 5,391,383 (edible spray oil); 6,022,577 (edible fats for food products); 5,434,278 (edible fats for food products); 5,268,192 (low calorie nut products); 5,258,197 (reduced calorie edible compositions); 4,335,156 (edible fat product); 7,288,278 (food additives or medicaments); 7,115,760 (fractionation process); 6,808,737 (structural fats); 5,888,947 (engine lubricants); 5,686,131 (edible oil mixtures); and 4,603,188 (curable urethane compositions), each of which is incorporated herein by reference.

[0241] In one embodiment of the invention, transesterification of the biomass, as described above, is followed by reaction of the transesterified product with polyol, as reported in US Patent No. 6,465,642, incorporated herein by reference, to produce polyol fatty acid polyesters. Transesterification can also be performed on microbial biomass with short chain fatty acid esters, as reported in U.S. Patent 6,278,006, incorporated herein by reference.

C. Hydroxylation: Saturation via the Addition of Water to Double Bonds

[0242] Hydroxylation involves the addition of water to a double bond resulting in saturation and the incorporation of a hydroxyl moiety. The hydroxylation process provides a mechanism for converting one or more fatty acid constituents of a glycerolipid to a hydroxy fatty acid. Hydroxylation can be performed, for example, via the method reported in US Patent No. 5,576,027, incorporated herein by reference. Hydroxylated fatty acids, including castor oil and its derivatives, are useful as components in several industrial applications, including as food additives, surfactants, pigment wetting agents, defoaming agents, water proofing additives, plasticizing agents, cosmetic emulsifying and/or deodorant agents, as well as in electronics, pharmaceuticals, paints, inks, adhesives, and lubricants.

[0243] Hydroxylation of microbial biomass produced by the methods described herein can be performed in conjuction with one or more of the methods and/or materials, or to produce products, as reported in the following: US Patent Nos. 6,590,113 (oil-based coatings and ink); 4,049,724 (hydroxylation process); 6,113,971 (olive oil butter); 4,992,189 (lubricants and lube additives); 5,576,027 (hydroxylated milk); and 6,869,597 (cosmetics), each of which is incorporated herein by reference.

[0244] Hydroxylated glycerolipids can be converted to estolides. Estolides consist of a glycerolipid in which a hydroxylated fatty acid constituent has been esterified to another fatty acid molecule. Conversion of hydroxylated glycerolipids to estolides can be carried out by warming a mixture of glycerolipids and fatty acids and contacting the mixture with a mineral

acid, as described by Isbell et al., *JAOCS* 71(2):169-174 (1994), incorporated herein by reference. Estolides are useful in a variety of applications, including without limitation those reported in the following: US Patent Nos. 7,196,124 (elastomeric materials and floor coverings); 5,458,795 (thickened oils for high-temperature applications); 5,451,332 (fluids for industrial applications); 5,427,704 (fuel additives); and 5,380,894 (lubricants, greases, plasticizers, and printing inks), each of which is incorporated herein by reference.

D. **Hydrolysis plus Derivatization: Cleavage and Modification of Free Fatty Acids**

[0245] Hydrolysis of the fatty acid constituents from the glycerolipids produced by the methods of the invention yields free fatty acids that can be derivatized to produce other useful chemical entities. Hydrolysis occurs in the presence of water and an acid or base catalyst. The liberated free fatty acids can be derivatized to yield a variety of products, as reported in the following: US Patent Nos. 5,304,664 (highly sulfated fatty acids); 7,262,158 (cleansing compositions); 7,115,173 (fabric softener compositions); 6,342,208 (emulsions for treating skin); 7,264,886 (water repellant compositions); 6,924,333 (paint additives); 6,596,768 (lipid-enriched ruminant feedstock); and 6,380,410 (surfactants for detergents and cleaners), each of which is incorporated herein by reference.

E. **Additional Chemical Reactions to Modify Lipid-Containing Microbial Biomass**

[0246] Other chemical reactions that can be performed on lipid-containing microbial biomass include reacting triacylglycerols with a cyclopropanating agent to enhance fluidity and/or oxidative stability, as reported in U.S. Patent 6,051,539; manufacturing of waxes from triacylglycerols, as reported in U.S. Patent 6,770,104; and epoxidation of triacylglycerols, as reported in "The effect of fatty acid composition on the acrylation kinetics of epoxidized triacylglycerols", Journal of the American Oil Chemists' Society, 79:1, 59-63, (2001) and Free Radical Biology and Medicine, 37:1, 104-114 (2004), each of which is incorporated herein by reference.

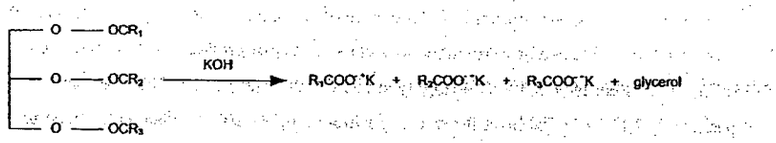
[0247] In some methods, the first step of modification is hydroprocessing to saturate double bonds, followed by deoxygenation at elevated temperature in the presence of hydrogen and a catalyst. In some methods, hydrogenation and deoxygenation occur in the same reaction. In other methods deoxygenation occurs before hydrogenation. Isomerization is then optionally performed, also in the presence of hydrogen and a catalyst. Finally, gases and naphtha components can be removed if desired. For example, see U.S. Patents 5,475,160

(hydrogenation of triglycerides); 5,091,116 (deoxygenation, hydrogenation and gas removal); 6,391,815 (hydrogenation); and 5,888,947 (isomerization), each of which is incorporated herein by reference.

F. Saponification of Oil-Bearing Microbial Biomass and Extracted Oil

1. Basic Chemistry of Saponification

[0248] Animal and plant oils are typically made of triacylglycerols (TAGs), which are esters of fatty acids with the trihydric alcohol, glycerol. In an alkaline hydrolysis reaction, the glycerol in a TAG is removed, leaving three carboxylic acid anions that can associate with alkali metal cations such as sodium or potassium to produce fatty acid salts. A typical reaction scheme is as follows:



[0249] In this scheme, the carboxylic acid constituents are cleaved from the glycerol moiety and replaced with hydroxyl groups. The quantity of base (*e.g.*, KOH) that is used in the reaction is determined by the desired degree of saponification. If the objective is, for example, to produce a soap product that comprises some of the oils originally present in the TAG composition, an amount of base insufficient to convert all of the TAGs to fatty acid salts is introduced into the reaction mixture. Normally, this reaction is performed in an aqueous solution and proceeds slowly, but may be expedited by the addition of heat. Precipitation of the fatty acid salts can be facilitated by addition of salts, such as water-soluble alkali metal halides (*e.g.*, NaCl or KCl), to the reaction mixture. Preferably, the base is an alkali metal hydroxide, such as NaOH or KOH. Alternatively, other bases, such as alkanolamines, including for example triethanolamine and aminomethylpropanol, can be used in the reaction scheme. In some embodiments, these alternatives may be preferred to produce a clear soap product.

2. Saponification of Oil Bearing Biomass

[0250] Saponification of oil bearing microbial biomass can be performed in accordance with the methods of the invention on intact biomass or biomass that has been disrupted prior to being subjected to the alkaline hydrolysis reaction. In the former case, intact microbial biomass generated via the culturing of microorganisms as described herein can be directly

contacted with a base to convert ester-containing lipid components of the biomass to fatty acid salts. In some embodiments, all or a portion of the water in which the microbes have been cultured is removed and the biomass is resuspended in an aqueous solution containing an amount of base sufficient to saponify the desired portion of the glycerolipid and fatty acid ester components of the biomass. In some embodiments, less than 100% of the glycerolipids and fatty acid esters in the biomass are converted to fatty acid salts.

[0251] In some methods of the invention, the biomass is disrupted prior to being subjected to the alkaline hydrolysis reaction. Disruption of the biomass can be accomplished via any one or more of the methods described above for lysing cells, including heat-induced lysis, mechanical lysis, or the like, to make the intracellular contents of the microorganisms more readily accessible to the base. This can help to facilitate the conversion of TAGs or fatty acid esters to fatty acid salts. Although acid-induced lysis can be used to disrupt the biomass prior to saponification, other methods may be more desirable to reduce the possibility that additional base will be consumed to neutralize any remaining acid during the alkaline hydrolysis reaction, which may impact the conversion efficiency to fatty acid salts. Because the application of heat can expedite the alkaline hydrolysis reaction, heat-induced lysis can be used prior to or during the saponification reaction to produce the fatty acid salts.

[0252] In some embodiments of the invention, the biomass is not subjected to any treatment, or any treatment other than disruption, prior to being subjected to the alkaline hydrolysis reaction. In some embodiments, prior enrichment of the biomass to increase the ratio of lipid to non-lipid material in the biomass to more than 50% (or by more than 50%) by weight, is performed as described herein. In other embodiments, the biomass is subjected to the alkaline hydrolysis reaction without a step of prior enrichment. In some embodiments, the biomass subjected to the alkaline hydrolysis reaction contains components other than water in the same relative proportions as the biomass at the point of harvesting. In those embodiments in which substantially all of the water has been removed, the biomass comprises a cellular emulsion or substantially-dried emulsion concentrate.

[0253] Any of the microorganisms described herein can be used to produce lipid-containing biomass for the production of saponified oils. In some embodiments, the microorganisms can also impart other characteristics to the saponified-oil compositions produced from the methods described herein. For example, microalgae of different species, as well as microalgae grown under different conditions, vary in color, including green, yellow, orange, red, and the like. Small quantities of the compounds that impart these colors to the

microalgae can be purposefully retained so that the resulting saponified-oil compositions and thereby provide natural colorants. In some embodiments, other constituents of the biomass, including carotenoids and xanthophylls, can also be retained in small quantities in the saponified-oil compositions.

[0254] The extent of saponification of the biomass can vary in the methods of the invention. In some embodiments, it is desirable to produce a saponified-oil composition that also includes glycerolipid constituents of the biomass. The appropriate quantity of base (*e.g.*, NaOH) for use in the alkaline hydrolysis reaction can be determined based on an analysis of the glycerolipid and fatty acid ester content of the biomass. In some embodiments, it is preferable to use an excess of base to saponify lipid-containing biomass directly, because some of the base may be consumed by reaction with other constituents of the biomass. In some embodiments, the use of excess quantities of base to saponify the ester-containing lipid constituents of the biomass results in a saponified oil composition that is undesirably alkaline. In these instances, the composition can be purified to reduce the alkalinity of the composition by boiling the saponified oil composition in water and re-precipitating the fatty acid salts via addition of salts such as NaCl, KCl, or the like. The purified soap composition can then be subjected to further processing, such as removing excess water, introducing various additives into the soap composition, molding the soap into bars or other shapes, and the like.

[0255] In some embodiments, the fatty acid salts (also referred to as saponified oils) generated from the methods described herein can be combined with one or more additives selected from essential oils, fragrance oils, flavor oils, botanicals, extracts, CO_2 extracts, clays, colorants, titanium dioxide, micas, tinting herbs, glitters, exfoliants, fruit seeds, fibers, grain powders, nut meals, seed meals, oil beads, wax beads, herbs, hydrosols, vitamins, milk powders, preservatives, antioxidants, tocopherols, salts, sugars, vegetable oils, waxes, glycerin, sea vegetables, nutritive oils, moisturizing oils, vegetable butters, propylene glycol, parabens, honey, bees wax, aloe, polysorbate, cornstarch, cocoa powder, coral powder, humectants, gums, emulsifying agents, and thickeners, or any other additives described herein.

3. Saponification of Extracted Oil

[0256] The degree of saponification of extracted lipid constituents of the biomass can be more readily controlled because of a reduced probability that the base will be consumed through interaction with components other than glycerolipids or fatty acid esters present in

the extracted oil. Extraction of the lipid constituents can be performed via conventional hexane-extraction procedures, or via an oil-extraction or solventless-extraction procedure.

[0257] Conventional hexane-extraction (other suitable organic solvents can also be used) generally comprises contacting the biomass or lysate with hexane in an amount and for a period of time sufficient to allow the lipid to form a solution with the hexane. The mixture can then be filtered and the hexane removed by, for example, rotoevaporation. Hexane extraction methods are well known in the art.

[0258] Oil extraction includes the addition of an oil directly to a lysate without prior separation of the lysate components. After addition of the oil, the lysate separates either of its own accord or as a result of centrifugation or the like into different layers. The layers can include in order of decreasing density: a pellet of heavy solids, an aqueous phase, an emulsion phase, and an oil phase. The emulsion phase is an emulsion of lipids and aqueous phase. Depending on the percentage of oil added with respect to the lysate (w/w or v/v), the force of centrifugation, if any, volume of aqueous media and other factors, either or both of the emulsion and oil phases can be present. Incubation or treatment of the cell lysate or the emulsion phase with the oil is performed for a time sufficient to allow the lipid produced by the microorganism to become solubilized in the oil to form a heterogeneous mixture.

[0259] In various embodiments, the oil used in the extraction process is selected from the group consisting of oil from soy, rapeseed, canola, palm, palm kernel, coconut, corn, waste vegetable oil, Chinese tallow, olive, sunflower, cotton seed, chicken fat, beef tallow, porcine tallow, microalgae, macroalgae, *Cuphea*, flax, peanut, choice white grease (lard), *Camelina sativa* mustard seedcashew nut, oats, lupine, kenaf, calendula, hemp, coffee, linseed, hazelnut, euphorbia, pumpkin seed, coriander, camellia, sesame, safflower, rice, tung oil tree, cocoa, copra, pium poppy, castor beans, pecan, jojoba, jatropha, macadamia, Brazil nuts, and avocado. The amount of oil added to the lysate is typically greater than 5% (measured by v/v and/or w/w) of the lysate with which the oil is being combined. Thus, a preferred v/v or w/w of the oil is greater than 5%, or at least 6%, at least 7%, at least 10%, at least 20%, at least 25%, at least 30%. at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, and at least 95% of the the cell lysate.

[0260] Lipids can also be extracted from a lysate via a solventless extraction procedure without substantial or any use of organic solvents or oils by cooling the lysate. In such methods, the lysate is preferably produced by acid treatment in combination with above room temperature. Sonication can also be used, particularly if the temperature is between room

temperature and 65°C. Such a lysate on centrifugation or settling can be separated into layers, one of which is an aqueous:lipid layer (the "emulsion" layer). Other layers can include a solid pellet, an aqueous layer, and a lipid layer. Lipid can be extracted from the emulsion layer by freeze thawing or otherwise cooling the emulsion. In such methods, it is not necessary to add any organic solvent or oil. If any solvent or oil is added, it can be below 5% v/v or w/w of the lysate.

[0261] The separated or extracted lipids are then subjected to an alkaline hydrolysis reaction as described above, in which the amount of base added to the reaction mixture can be tailored to saponify a desired amount of the glycerolipid and fatty acid ester constituents of the lipid composition. A close approximation or quantification of the amount of esterified lipid in the composition can be used to tailor the amount of base needed to saponify a specified portion of the oil, thereby providing an opportunity to modulate the amount of unsaponified oil remaining in the resulting composition. In some embodiments, at least 1%, at least 2%, at least 3%, at least 4%, at least 5%, at least 6%, at least 7%, at least 8%, at least 9%, or at least 10% of the oil, by weight, remains unsaponified in the resulting composition. In other embodiments, it may be desirable to saponify all or substantially all of the oil, such that the resulting composition contains no more than 10%, no more than 9%, no more than 8%, no more than 7%, no more than 6%, no more than 5%, no more than 4%, no more than 3%, no more than 2%, no more than 1%, or no more than 0.5% unsaponified oil by weight.

[0262] In various embodiments of the invention, the microbial biomass or oil can contain lipids with varying carbon chain lengths, and with varying levels of saturation. The characteristics of the lipids can result from the natural glycerolipid profiles of the one or more microorganism populations used to generate the biomass or oil subjected to the saponification reaction, or can be the result of lipid pathway engineering, as described herein, in which transgenic strains of microorganisms that produce particular lipids in greater proportions are produced.

[0263] The microbial biomass subjected to transesterification or other chemical modification, as described herein, can optionally be subjected to a process of prior enrichment that increases the ratio of the lipids to the dry weight of the microbes. In some embodiments, the ratio of lipids to non-lipid materials in the biomass is increased by more than 10%, by more than 20%, by more than 30%, by more than 40%, by more than 50%, by more than 60%, by more than 70%, by more than 80%, by more than 90%, or by more than 100% by weight. In some methods of the invention, the biomass is subjected to the chemical

reaction without a step of prior enrichment, or, in some embodiments, without a step of prior enrichment that increases the ratio by more than 50%. Enrichment of the ratio of lipids to non-lipid material can be accomplished by, for example, the addition of lipids obtained from a source other than the microbial biomass (e.g., from a second microbial biomass culture, from a plant or seed-oil source, or the like). Whether or not subjected to optional enrichment, the lipid component comprises no more than 50%, no more than 60%, no more than 70%, no more than 80%, no more than 90%, or no more than 95% of the biomass subjected to the chemical reaction, and preferably the lipid component comprises no less than 15%, no less than 20%, no less than 30%, no less than 35%, no less than 40%, or no less than 45% of the biomass. In some embodiments, the harvested biomass comprises a lipid content of at least 5%, at least 10%, at least 15%, at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, or at least 90% by DCW.

[0264] In some embodiments, water is removed from the biomass prior to subjecting the biomass to the saponification (or other chemical modification) reaction. In some embodiments of the invention, the microbial biomass is not subjected to any treatment, other than removing water and/or lysis, prior to subjecting the biomass to the saponification(or other chemical modification) reaction. In some embodiments, the biomass subjected to the chemical reaction contains components other than water in the same relative proportions as the biomass at the point of harvesting from the fermentation. In this context, "the same relative proportions" means that the proportions of the components remain substantially the same after having accounted for changes associated with the cells' use or metabolic conversion of some components following harvesting of the biomass, chemical conversion of some components within the harvested biomass (without the application of exogenous reagents or catalysts), the escape of gases from the harvested biomass, and/or similar modifications of the relative proportions that are not readily controllable. The phrase "the same relative proportions" is also meant to account for some level of experimental variability, e.g, ± 5%.

[0265] In some methods of the invention, the covalently modified lipid is separated from other components of the biomass following chemical modification of the lipid. In some embodiments, separating the lipid comprises a phase separation whereby the covalently modified lipids form a lighter non-aqueous phase and components of the biomass form one or more heavier phases. The lighter non-aqueous phase can then be removed to isolate the

covalently modified lipid components. In some embodiments, separation of a lipophilic phase containing the covalently modified lipids from hydrophilic cell material of the biomass can be facilitated by centrifugation or other techniques. The ratio of the covalently modified lipid to the biomass from which it is separated can be between 10% lipid to 90% biomass and 90% lipid to 10% biomass by dry weight.

4. Advantages of Biomass with Higher Saturated Oil Content and Fewer Colored Impurities

[0266] Although biomass and/or extracted oil for use in the saponification methods described herein can be derived from any one of a number of microorganisms with varying glycerolipid profiles and varying ratios of other constituents such as pigments, in a preferred embodiment, the biomass and/or the extracted oil comprises a relatively high ratio of saturated fatty acids within the TAGs and a relatively low ratio of constituents that impart a color to the oil (*e.g.*, pigments). In one embodiment, the biomass and/or extracted oil is derived from microalgae of the genus *Prototheca*.

[0267] The saturation characteristics of the fatty acid constituents of a saponified oil, as well as the presence of colored constituents, impact the shelf-life of compositions comprising the saponified oil, as well as their aesthetic qualities. Saturated fatty acids are less prone to oxidation than their unsaturated counterparts. Thus, use of saponified oils with a relatively higher ratio of saturated:unsaturated fatty acid constituents in the preparation of saponified oil products results in a longer overall shelf-life and minimizes the development of oxidation products, which often have an unpleasant odor. Similarly, the relative absence of colored impurities, which, upon oxidation tend to change the appearance of the saponified oil composition in which they are incorporated, improves the aesthetic qualities of the composition and consumer satisfaction with such products, particularly over an extended shelf-life. Consumers of the resulting soap tend to associate a particular color or lack of color with a brand of soap and come to expect the same color of product every time. The lack of color in the saponified oil allows for more consistency in the resulting saponified oil.

[0268] Higher ratios of saturated fatty acids are particularly advantageous in the preparation of saponified compositions, discussed below, in which a portion of the glycerolipids within the biomass (or the extracted oil) remains unsaponified. As discussed previously, a percentage of the glycerolipids can remain unmodified (unsaponified) by adjusting the quantity of base used in the saponification reaction, thus producing a soap product that retains some proportion of the originally present glycerolipids. The presence of

an excess of glycerolipids in a saponification reaction is commonly referred to as "superfatting." The extra oils remaining in the product following the saponification reaction impart moisturizing properties to the composition, but like any oil, are subject to oxidation, which can lead to the development of an unpleasant-smelling composition. Use of a higher ratio of saturated:unsaturated fatty acid constituents as the "superfatting" components of the reaction mixture results in a product with a relatively longer shelf-life and minimizes the production of malodorous oxidative products.

[0269] In various embodiments, saturated fatty acid constituents comprise from 1-100% of the ester-containing lipid components of the microbial biomass or extracted oil subjected to an alkaline hydrolysis reaction in accordance with the methods of the present invention. In preferred embodiments, saturated fatty acid constituents comprise at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, or at least 99% of the ester-containing lipid components in the alkaline hydrolysis reaction.

[0270] In some embodiments, color-generating impurities (*e.g.*, carotenoids) are present in the microbial biomass or the extracted oil at a concentration of no more than 500 ppm, no more than 250 ppm, no more than 100 ppm, no more than 75 ppm, or no more than 25 ppm. Color-generating impurities include carotenoids such as lutein, beta carotene, zeaxanthin, astaxanthin and chlorophyll. In other embodiments, the amount of chlorophyll that is present in the microbial biomass or the extracted oil is less than 0.1 mg/kg, less than 0.05 mg/kg, or less than 0.01 mg/kg.

[0271] In some embodiments, the microbial oil or soap, before or after saponification, respectively, contains less than 60 micrograms, less than 59 micrograms, less than 58 micrograms, less than 57 micrograms, less than 56 micrograms, less than 55 micrograms, less than 54 micrograms, less than 53 micrograms, less than 52 micrograms, less than 51 micrograms, less than 50 micrograms, less than 49 micrograms, less than 48 micrograms, less than 47 micrograms, less than 46 micrograms, less than 45 micrograms, less than 44 micrograms, less than 43 micrograms, less than 42 micrograms, less than 41 micrograms, less than 40 micrograms, less than 39 micrograms, less than 38 micrograms, less than 37 micrograms, less than 36 micrograms, less than 35 micrograms, less than 34 micrograms, less than 33 micrograms, less than 32 micrograms, less than 31 micrograms, less than 30 micrograms, less than 29 micrograms, less than 28 micrograms, less than 27 micrograms, less than 26 micrograms, less than 25 micrograms, less than 24 micrograms, less than 23 micrograms, less than 22 micrograms, less than 21 micrograms, less than 20 micrograms, less

than 19 micrograms, less than 18 micrograms, less than 17 micrograms, less than 16 micrograms, less than 15 micrograms, less than 14 micrograms, less than 13 micrograms, less than 12 micrograms, less than 11 micrograms, less than 10 micrograms, less than 9 micrograms, less than 8 micrograms, less than 7 micrograms, less than 6 micrograms, less than 5 micrograms or less than 4 micrograms carotenoids per gram of saponified oil.

[0272] Microalgae of the genus *Prototheca*, including without limitation, *Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis,* and *Prototheca zopfii* naturally produce higher ratios of saturated lipid constituents, as illustrated in Example 28. Moreover, oils extracted from microalgae of the genus *Prototheca* generally include fewer color-generating impurities, allowing for the production of colorless compositions comprising the saponified oils. Thus, use of such microorganisms as the source of biomass or oil for practicing saponification methods in accordance with the present invention is preferred.

VI. COMPOSITIONS

[0273] The present invention also provides compositions that can be prepared by the methods described herein. In each of the various compositions of the present invention, the microbial biomass is selected from the group consisting of bacteria, cyanobacteria, eukaryotic microalgae, oleaginous yeast, and fungi. In some embodiments, the microbial biomass is selected from biomass derived from microbes in the group consisting of the eukaryotic microalgae listed in Table 1. In some embodiments, the microbial biomass is a species of the genus *Chlorella*, and in some embodiments, the species is selected from the group consisting of *Chlorella fusca, Chlorella protothecoides, Chlorella pyrenoidosa, Chlorella kessleri, Chlorella vulgaris, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana* and *Chlorella ellipsoidea*. In one embodiment, the species is *Chlorella protothecoides*. In some embodiments, the microbial biomass is derived from a yeast selected from the group consisting of the oleaginous yeast listed in Table 2, or is derived from a fungus selected from the group consisting of the fungi listed in Table 3.

[0274] In one embodiment, the present invention is directed to a composition comprising a lighter phase containing fatty acid alkyl esters and at least one heavier phase containing microbial biomass.

[0275] In various embodiments of the composition, at least 20% of the fatty acid alkyl esters are C18. In other embodiments, at least 30%, at least 40%, or at least 50% of the fatty acid alkyl esters are C18. In some embodiments, at least 50% of the fatty acid alkyl esters are

C16 or longer chain lengths. In some embodiments, at least 10% of the fatty acid alkyl esters are C14 or shorter chain lengths. In some embodiments, at least 20% of the fatty acid alkyl esters are C14 or shorter chain lengths.

[0276] In some embodiments, the composition comprises heteroatoms in varying amounts. In some embodiments, the amount of calcium and magnesium combined by weight in the lighter phase is no greater than 5 parts per million. In some embodiments, the amount of phosphorous in the lighter phase is no greater than 0.001%, by mass. In some embodiments, the amount of sulfur in the lighter phase is no greater than 15 parts per million. In some embodiments, the amount of potassium and sodium combined by weight in the lighter phase is no greater than 5 parts per million. In some embodiments, the total carotenoid content of the lighter phase is no greater than 100 micrograms of carotenoid per gram.

[0277] In another embodiment, the present invention provides a composition comprising a lightest phase containing completely saturated lipids, and at least one heavier phase containing microbial biomass.

[0278] In still another embodiment, the present invention provides a composition comprising a lighter phase containing lipids and at least one heavier phase containing microbial biomass from more than one species or strain. In yet another embodiment, the present invention provides a composition comprising a lighter phase containing hydroxylated lipids and at least one heavier phase containing microbial biomass. In another embodiment, the present invention provides a composition comprising a lighter phase containing free fatty acids and at least one heavier phase containing microbial biomass.

[0279] In still another embodiment, the present invention provides a composition comprising saponified oils derived from the alkaline hydrolysis of biomass produced by culturing a population of microbes, as described above. In some embodiments, the biomass from which the saponified oils are derived comprises a mixture of biomass from two or more distinct strains or species of microbes that have been separately cultured. In one embodiment, at least two of the distinct strains or species of microbes, the biomass from which is combined, comprise different glycerolipid profiles. In different embodiments, the composition can be a solid (including a powder) or a liquid.

[0280] Saponified oil compositions of the invention can include fatty acid salts derived from one or more species of microorganisms, as described herein, and may include carotenoids or other components derived directly from the biomass from which saponified oils were prepared. In some embodiments, the saponified oil compositions include, without

limitation, β-carotene, α-carotene, astaxanthin, α-cryptoxanthin, β-cryptoxanthin, lutein, lycopene, phytoene, phytofluene, and/or zeaxanthin. In some embodiments, the saponified oil compositons include an algal polysaccharide, such as those described in international publication number WO/2007/084769, incorporated herein by reference.

[0281] In some embodiments, the saponified oil compositions comprise various proportions of unsaponified glycerolipids derived from the biomass. In various embodiments, the unsaponified glycerolipids derived from the biomass comprise at least 2%, at least 3%, at least 4%, at least 5%, at least 10%, at least 20%, at least 30%, at least 40%, or at least 50% of the saponified oil composition. In other embodiments, the unsaponified glycerolipids comprise no more than 25%, no more than 20%, no more than 15%, no more than 10%, no more than 9%, no more than 8%, no more than 7%, no more than 6%, no more than 5%, no more than 4%, no more than 3%, no more than 2%, or no more than 1% of the saponified oil composition.

[0282] In various embodiments of the saponified oil compositions in accordance with the invention, the saponified oil comprises at least 5%, at least 10%, at least 15%, at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% of the composition's total mass. In some embodiments, the saponified oil comprises no more than 80%, no more than 75%, no more than 70%, no more than 65%, no more than 60%, no more than 55%, no more than 50%, no more than 45%, no more than 40%, no more than 35%, no more than 30%, no more than 25%, no more than 20%, no more than 15%, no more than 10%, or no more than 5% of the composition's total mass. In some embodiments, components derived from the biomass, including without limitation, saponified oils, unsaponified oils, carotenoids, and the like, constitute at least 5%, at least 10%, at least 15%, at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% of the composition's total mass. In other embodiments, components derived from the biomass constitute no more than 80%, no more than 75%, no more than 70%, no more than 65%, no more than 60%, no more than 55%, no more than 50%, no more than 45%, no more than 40%, no more than 35%, no more than 30%, no more than 25%, no more than 20%, no more than 15%, no more than 10%, or no more than 5% of the composition's total mass.

[0283] In some embodiments of the saponified oil composition, the composition further includes at least one oil selected from soy, rapeseed, canola, palm, palm kernel, coconut, corn, waste vegetable, Chinese tallow, olive, sunflower, cotton seed, chicken fat, beef tallow, porcine tallow, microalgae, macroalgae, Cuphea, flax, peanut, choice white grease, lard, Camelina sativa, mustard seed cashew nut, oats, lupine, kenaf, calendula, hemp, coffee, linseed (flax), hazelnut, euphorbia, pumpkin seed, coriander, camellia, sesame, safflower, rice, tung oil tree, cocoa, copra, pium poppy, castor beans, pecan, jojoba, jatropha, macadamia, Brazil nuts, or avocado.

[0284] In some embodiments of the saponified oil composition, one or more additives are combined with the fatty acid salts. In some embodiments, the additives are selected to optimize the cleansing efficiency of the composition when used, for example, as a skin cleanser. In other embodiments, the additives are selected with regard to a characteristic imparted by the additive to the composition that appeals to a consumer. In some embodiments, additives are selected for both optimization of cleansing efficiency and for consumer appeal. In the various embodiments, the additives are selected from essential oils, fragrance oils, flavor oils, botanicals, extracts, CO_2 extracts, clays, colorants, titanium dioxide, micas, tinting herbs, glitters, exfoliants, fruit seeds, fibers, grain powders, nut meals, seed meals, oil beads, wax beads, herbs, hydrosols, vitamins, milk powders, preservatives, antioxidants, tocopherols, salts, sugars, vegetable oils, waxes, glycerin, sea vegetables, nutritive oils, moisturizing oils, vegetable butters, propylene glycol, parabens, honey, bees wax, aloe, polysorbate, cornstarch, cocoa powder, coral powder, humectants, gums, emulsifying agents, and thickeners. These additives are commercially available from a number of skin care ingredient and bath accessory suppliers.

[0285] Essential oils include allspice, amyris, angelica root, anise seed, basil, bay, bergamot, black pepper, cajeput, camphor, cananga, cardamom, carrot seed, cassia, catnip, cedarwood, chamomile, cinnamon bark, cinnamon leaf, citronella java, clary sage, clovebud, coriander, cornmint, cypress, davana, dill seed, elemi, eucalyptus, fennel, fir, frankincense, geranium bourbon, geranium roast, geranium, ginger, grapefruit pink, grapefruit, gurjum balsam, hyssop, juniper berry, lavandin, lavandula, lavender, lemon myrtle, lemon tea tree, lemon, lemongrass, lime, litsea cubeba, mandarin, marjoram, mullein, myrrh, neroli, nerolina, niaouli, nutmeg, orange, palmarosa, patchouli, peppermint, petitgrain, pine needle, ravensara, ravintsara, rosalina, rose, rosemary, rosewood, sage, sandalwood, spearmint, spikenard, star

anise, tangerine, tea tree, thyme, tulsi, verbena, vetiver, ylang ylang, and zdravetz, or combinations thereof.

[0286] Fragrance and flavor oils include absolute tulip, almond, amaretto, amber, anais, apple, apple cinnamon, apple spice, apricot, apricot crème, arabian musk, asian pear, asian plum blossom, autumn woods, banana, basil, basil nectarine, bay rum, bayberry, bergamot, berries and cream, birthday cake, black cherry, black tea, blackberry tea, blackcurrent, blue nile, blueberry delight, brambleberry preserves, brown sugar, bubble gum, buttercream, butterscotch, calla lily, cantaloupe, caramel apple, carnation, carrot cake, chai tea, chamomile, china musk, china rain, chinese peony, chrysanthemum, cinnamon, coconut, coconut cream, cotton candy, cranberry, cucumber, cucumber melon, daffodil, dandelion, delphinium, dewberry, dulce de leche, earl grey tea, easter cookie, egg nog, eqyptian musk, enchanted forest, english lavender, english pear, evergreen, fig, frangipani, frankincense, french vanilla, fresh apple, fresh brewed coffee, fruit punch, gardenia, geranium, ginger lily, gingerbread, grape, grapefruit, green apple, green grass, green tea, guava, guava flower, hawaiian white ginger, heliotrope, hemp, herbaceous, holiday fruitcake, hollyberry, honey ginger, honey, honeysuckle, jasmine, jasmine tea, juniper berries, kiwi, lavender, leather, lemon, lemon parsley, lilac, lime, loganberry, lotus blossom, magnolia, mandarin, mango, mango and kiwi, maple, milk chocolate, mimosa, minty lime, mulberry, myrrh, neroli, oakmoss, oatmeal, ocean rain, orange blossom, orange sherbet, orange vanilla, papaya, passion fruit, patchouli, peach, peaches and cream, pearberry, peppermint, pikaki, pina colada, pineapple, pomegranate, pumpkin pie, raisins and almonds, raspberry, roasted nuts, rosewood, sage, sandalwood, sassafras, sea moss, sesame, siberian pine, snowberry, spanish moss, spice, strawberry, sugar plum, suntan lotion, sweet clove, sweet grass, sweet pea, tangerine, thai coconut, timber, tomato leaf, vanilla, watermelon, white chocolate, wild cherry, wisteria, witches brew, and ylang ylang, or combinations thereof.

[0287] Exfoliants include particles that can be used to dislodge dead skin cells, dirt, or other materials from the surface of the skin, and include without limitation, fruit seeds and fibers, grain powders, nut and seed meals, and oil or wax beads. Fruit fibers include blueberry, cranberry, grape, kiwi, raspberry, blackberry, strawberry, and the like. Grain powders include oat powder, and almond powder, or the like, milled to varying degrees of courseness. Polymer beads, such as those made from polyethylene, or the like, can also be used. The removal of dead skin cells and/or the outer most layer of skin can provide an

opportunity for bioactive agents, such as carotenoids, which can also be present in the compositions of the invention, to have greater access to deeper layers of the skin.

[0288] Extracts and CO_2 extracts include herbal extracts derived from conventional extraction procedures, or via the use of liquified carbon dioxide. Herbs include aloe vera leaf, alfalfa leaf, alkanet root, annatto seed, arrowroot, burdock root, calendula petals, carrot root, chamomile flower, comfrey leaf, cornsilk, dutch blue poppies, fennel seed, ginger root, ginseng, green tea leaf, jasmine flower, juniper berries, lavender buds, lemon peel, lemongrass, marshmallow root, nettles, oat straw, orange peel, paprika, parsley, peppermint leaf, rose buds, rose petals, rosehip, rosemary leaf, shavegrass, spearmint leaf, and St. john's wort, and combinations thereof.

[0289] Colorants and glitters include green #5, green #8, orange #4, red #22, red #33, violet #2, blue #1, green #3, red #40, yellow #5, yellow #6, green #6, red #17, as well as pearlescent micas and tinting herbs such as henna leaf, sandalwood, turmeric, cranberry, kiwi, raspberry, alkanet, annatto, carrot root, nettles, paprika, and parsley.

[0290] In various embodiments, the saponified oil composition containing one or more additives, as described above, is formulated for use as a cosmetic product. In some embodiments, the cosmetic product is a personal hygiene product, such as a cleansing composition for use on an individual's body or parts thereof (*e.g.*, face, legs, etc.).

[0291] In one aspect, the invention is directed to a kit comprising a saponified oil composition, as described herein, and an oral supplement. In one embodiment, the oral supplement is a vitamin. In another embodiment, the oral supplement is an herb.

[0292] In another aspect, the invention is directed to a method of using saponified oil derived from the alkaline hydrolysis of biomass, produced as described herein, for admixture with one or more additives, as described above, and packaging the mixture as a cosmetic product. In one embodiment, the cosmetic product comprises a cleansing composition (*e.g.*, a facial cleanser).

[0293] Conventional DNA analysis methods can be used to detect the presence of components derived from microbial biomass in accordance with the present invention.

[0294] All references cited herein, including patents, patent applications, and publications, are hereby incorporated by reference in their entireties, regardless of whether previously specifically incorporated. The publications mentioned herein are cited for the purpose of describing and disclosing reagents, methodologies and concepts that may be used in connection with the present invention. Nothing herein is to be construed as an admission that

these references are prior art in relation to the inventions described herein. In particular, the following patent applications are hereby incorporated by reference in their entireties for all purposes: US Provisional Application No. 61/043,620 filed April 9, 2008, entitled "Direct Chemical Modification of Microbial Biomass"; US Provisional Application No. 61/074,610, filed June 20, 2008, entitled "Soaps and Cosmetic Products Produced from Oil-Bearing Microbial Biomass and Oils"; International publication number WO 2008/151149; and US Provisional Application No. 61/112,464 filed November 7, 2008, entitled "Cosmetic Compositions Comprising Microalgal Components".

[0295] Although this invention has been described in connection with specific embodiments thereof, it will be understood that it is capable of further modifications. Variations, uses, or adaptations of the invention following, in general, the principles of the invention and including such departures from the present disclosure as come within known or customary practice within the art to which the invention pertains and as may be applied to the essential features hereinbefore set forth, are included in the scope of the claims below. The following examples are offered to illustrate, but not to limit, the claimed invention.

VII. EXAMPLES

EXAMPLE 1

[0296] Unless otherwise noted, all strains described in this and the following Examples were obtained from the University of Texas Culture Collection of Algae (Austin, TX). In this example, *Chlorella* strains were tested for growth on glycerol and glucose. The following *Chlorella* species and strains were cultured: *Chlorella kessleri* (strains 263, 397, 398, 2228); *Chlorella sorokiniana* (strains 1663, 1665, 1669, 1671, 1810); *Chlorella saccharophila* (2911; 2469); *Chlorella protothecoides* (31, 249, 250, 264). Each strain was inoculated from solid media into 25 ml liquid base media (2 g/L yeast extract, 2.94 mM $NaNO_3$, 0.17 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.4 mM K_2HPO_4, 1.28 mM KH_2PO_4, 0.43 mM NaCl) and grown shaking at 27°C for 72 hours under a light intensity of 75 $\mu Em^{-2}s^{-1}$. These cultures were used to inoculate each strain to a final density of $1x10^5$ cells per ml into 24-well plates containing 2 ml of (a) base media only; (b) base media plus 0.1% glucose; and (c) base media plus 0.5% reagent grade glycerol (EM Science, catalog #GX0185-6). Plates were placed in the dark and grown for 72 hours shaking at 27°C. Samples of each strain grown in the three conditions were diluted 1.9:1 in distilled H_2O and absorbance was read at 600nm in a Molecular Devices SpectraMax 340PC. All strains exhibited growth in the presence of glucose and glycerol compared to only base media.

EXAMPLE 2

[0297] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #2 (STRAIN 264) and *Chlorella kessleri* #1 (STRAIN 398) stock cultures were maintained on modified Proteose medium. Modified Proteose medium consisted (g/L) of 0.25 g $NaNO_3$, 0.09 g K_2HPO_4, 0.175 g KH_2PO_4 0.025 g, 0.025 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.075 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 2 g yeast extract per liter. Glycerol wastes from biodiesel production (acidulated glycerol (AG) and non-acidulated glycerol (NAG)) were obtained from Imperial Western Products (Selma, CA, USA). "Pure" or "reagent grade" glycerol was from EM Science (a division of Merck KGA), catalog #GX0185-6. For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0298] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and were agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% (w/v) glucose was added to samples #4, 5, and 6 and the cells cultured another 24 hr. To measure DCW, 1 ml of each culture was pelleted by centrifugation at 5,000 rpm for 5 min in an Eppendorf 5415C centrifuge. After removing supernatant, cell pellets were frozen at -80 °C and lyophilized in a lab scale freeze dryer (Labconco, MO, USA). Results are shown in Figure 1.

EXAMPLE 3

[0299] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #3 (STRAIN 249) and *Chlorella kessleri* #2 (strain 397) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0300] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at

430 rpm. After 96 hr, cell growth was measured for DCW (see EXAMPLE 2). Results are shown in Figure 2.

EXAMPLE 4

[0301] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #3 (STRAIN 249), #4 (STRAIN 31), and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0302] Each strain was inoculated to media containing different glycerols (pure, acidulated, or non-acidulated) to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr, lipid contents were measured. To measure the amount of lipid content in cells, 100 µl of cultures were collected and washed once with same volume of media. To each tube, 5 µl of washed cells and 200 µl of sulfuric acid (18 M) were added. The tubes were incubated at 90°C in a water bath for 30 min, and 1 ml of phosphoric acid–vanillin reagent was added to the tubes and incubated at 37°C for 15 min. To prepare the phosphoric acid–vanillin reagent, 0.12 g of vanillin was added to 20 ml of water, and the volume adjusted to 100 ml with 85% phosphoric acid. The optical density at 530 nm was read in a glass cuvette against a reference tube with 5 µl water as sample. Results are shown in Figure 3.

EXAMPLE 5

[0303] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #2 (STRAIN 264) and *Chlorella kessleri* #1 (STRAIN 398) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0304] Each strain was inoculated to media containing different glycerols (pure or non-acidulated) to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1%

glucose was added to sample #3 and #4 and the cells cultured another 24 hr. Lipid contents were measured in all samples (see EXAMPLE 4). The optical density at 600 nm was also measured to check for non-specific absorbance and subtracted from O.D. 530 nm to calculate the amount of lipid. The reference curve is composed of Triolein dissolved in chloroform ranging from 1 to 10 µg. Results are shown in Figure 4.

EXAMPLE 6

[0305] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #3 (STRAIN 249) and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0306] Each strain was inoculated to media containing different glycerols (pure, acidulated, or non-acidulated) to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% glucose was added and the cells cultured another 24 hr. DCW and lipid content were measured in all samples (see EXAMPLES 2 and 5). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by DCW. Results are shown in Figure 5.

EXAMPLE 7

[0307] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #2 (STRAIN 264) and *Chlorella kessleri* #1 (STRAIN 398) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0308] Each strain was inoculated to media containing either 1 % pure or 1 % non-acidulated glycerol to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% glucose was added and the cells cultured another 24 hr. DCW and lipid content were measured in all samples (see EXAMPLE 1 and 4). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by dried cell weight. Results are shown in Figure 6.

EXAMPLE 8

[0309] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #4 (STRAIN 31) and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2) For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0310] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr of initial growth, lipid contents were measured (see EXAMPLE 5). Results are shown in Figure 7.

EXAMPLE 9

[0311] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #3 (STRAIN 249), #4 (STRAIN 31) and *Chlorella kessleri* #1 (STRAIN 398) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0312] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% (w/v) glucose was added to #3 media and the cells cultured another 24 hr. DCW and lipid contents were measured in all samples (see EXAMPLES 2 and 5). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by dried cell weight. Results are shown in Figure 8.

EXAMPLE 10

[0313] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #3 (STRAIN 249), and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

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

[0314] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% (w/v) glucose was added to #2, #4, and #6 media and the cells cultured another 24 hr. Lipid contents were measured in all samples (see EXAMPLE 4). Results are shown in Figure 9.

EXAMPLE 11

[0315] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250), #3 (STRAIN 249), #4 (STRAIN 31) and *Chlorella kessleri* #2 (STRAIN 397) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 2). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0316] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% (w/v) glucose was added to #2, #4, and #6 media and the cells cultured another 24 hr. DCW was measured in all samples (see EXAMPLE 2). Results are shown in Figure 10.

EXAMPLE 12

[0317] Strains and Media: (a) *Spirulina platensis* (UTEX 2340) and (b) *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) stock culture of *Spirulina* was maintained in Spirulina medium and *Navicula* was maintained in soil extract medium (SEM). Spirulina medium consisted of 162 mM $NaHCO_3$, 38 mM Na_2CO_3, 1.9 mM K_2HPO_4, 29 mM $NaNO_3$, 5.75 mM K_2SO_4, 17.1 mM NaCl, 0.8 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 mM Na_2EDTA, 0.36 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.21 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.037 mM $ZnCl_2$, 0.0085 mM $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.017 mM $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.78 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.15 μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 μM H_3BO_3, and 0.001 mM Vitamin B_{12}. Soil extract medium consisted of 2.94 mM $NaNO_3$, 0.17 mM$CaCl_2 \cdot 2H_2O$,

0.3 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.43 mM K_2HPO_4, 1.29 mM KH_2PO_4, 0.43 mM NaCl, and soil extract. Glycerol wastes from biodiesel production (acidulated glycerol (AG) and non-acidulated glycerol (NAG)) were obtained from Imperial Western Products (Selma, CA, USA). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

(a)

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

(b)

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

[0318] Each strain was inoculated to different media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr, lipid contents were measured. To measure the amount of lipid content in cells, 100 µl of cultures were collected and washed once with same volume of media. To each tube, 5 µl of washed cells and 200 µl of sulfuric acid 18 M were added. The tubes were incubated at 90 °C water bath for 30 min, and 1 ml of phosphoric acid–vanillin reagent were added to the tubes and incubated at 37 °C for 15 min. To prepare the phosphoric acid–vanillin reagent, 0.12 g of vanillin was added to 20 ml of water, and the volume adjusted to 100 ml with 85% phosphoric acid. The optical density at 530 nm was read in a glass cuvette against a reference tube with 5 µl water as sample. The reference curve is composed of Triolein dissolved in chloroform ranging from 1 to 10 µg.

[0319] To measure DCW, 0.5 ml of each culture was pelleted by centrifugation at 5000 rpm for 5 min. After removing supernatant, cell pellets were frozen at -80 °C and dried overnight in a Freeze Dry system (Labconco, MO, USA). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by dried cell weight. Results are shown in Figure 11.

EXAMPLE 13

[0320] Strains and Media: *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) stock cultures were maintained on modified Proteose medium. Modified Proteose medium consisted (g/L) of 0.25 g $NaNO_3$, 0.09g K_2HPO_4, 0.175 g KH_2PO_4 0.025 g, 0.025 g $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, 0.075 g $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, and 2 g yeast extract per liter. For each growth condition, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

(a), (b)

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

[0321] *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) was inoculated to different media to 5×10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr, cell growth was measured by DCW, and lipid content was measured by phosphor-vanillin assay (see EXAMPLE 12). The lipid percentage was calculated from total lipid amount divided by dried cell weight. Results are shown in Figure 12.

EXAMPLE 14

[0322] Strains and Media: *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) stock cultures were maintained on soil extract medium (see EXAMPLE 12). For each growth condition, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

Navicula pelliculosa (UTEX 667) was inoculated to media containing glucose or different glycerols (pure, acidulated, or non-acidulated) to 5×10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr, cell growth was measured by DCW (see EXAMPLE 12). Results are shown in Figure 13.

EXAMPLE 15

[0323] Strains and Media: *Scenedesmus armatus* (UTEX 2552) and *Navicula pelliculosa* (UTEX 667) stock cultures were maintained on modified Proteose medium for *Scenedesmus armatus* and soil extract medium for *Navicula pelliculosa* (see EXAMPLE 1). For each strain, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

Scenedesmus armatus

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

Navicula pelliculosa

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

[0324] Each strain was inoculated to media to 5 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of initial growth, 1% glucose was added to sample #2 and the cells cultured another 24 hr. Cell growth was measured by DCW (see EXAMPLE 12). Results are shown in Figures 14 (a) and (b).

EXAMPLE 16

[0325] Strains and Media: *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 1). For each condition, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

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

[0326] *Chlorella protothecoides #4* (UTEX 31) was inoculated to media containing different sugars (glucose, or xylose) to 3 x 10^5 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 72 hr of growth, cell growth was measured by counting cell numbers of each culture. Results are shown in Figure 15.

EXAMPLE 17

[0327] *Chlorella protothecoides* strains #1, #3, and #4 stock cultures were maintained on modified Proteose medium (see EXAMPLE 1). For each condition, 1 ml of the following different media was prepared in 24-well plates.

1. Proteose

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

[0328] Each strain was inoculated to media containing different sugars (glucose, or fructose) to 1 x 10^6 cells/ml concentration. The cultures were kept in the dark and agitated by orbital shaker from Labnet (Berkshire, UK) at 430 rpm. After 96 hr of growth, cell density was measured by counting cell numbers of each culture. Results are shown in Figure 16.

EXAMPLE 18

Chlorella on Sucrose

[0329] *Chlorella protothecoides* (UTEX 249) was inoculated into three 50 ml flasks of Proteose media with 1% sucrose (2.94 mM $NaNO_3$, 0.428 mM K_2HPO_4, 1.28 mM KH_2PO_4, 0.427mM NaCl, 0.17 mM $CaCl_2$-$2H_2O$, 0.3 mM $MgSO_4$-$7H_2O$, protease peptone 1g/L) to a final cell density of 4x10^5 cells per ml. Invertase (Sigma #I4504) was added to two of the cultures at 0.01 U/ml and 0.05 U/ml. All three cultures were grown in the dark for ~60 hrs shaking at 150 rpm. Final cell counts were performed on all three cultures after ~60 hrs of shaking in the dark. The control flask reached 4.4x10^5 cells per ml while the 0.01 U/ml and 0.05 U/ml flasks reached cell densities of 1x10^8 and 3x10^8, respectively. Each flask was checked for contamination at the end of the experiment by microscopic analysis and all were clean.

EXAMPLE 19

Chlorella protothecoides Growth on Molasses with a Sucrose Invertase

[0330] Preparation of *Chlorella* cells for Inoculation: A 10 ml liquid culture of *Chlorella* was started taking the inoculum from a solid Proteose plate. The cultures were grown in light for approximately 2 days at 26°C. Growth was measured using an optical densitomer (OD) at 750 nm and by determining DCWs.

[0331] Preparation of Molasses and Sugar Stock Solutions: A 5% stock solution was prepared with glucose, sucrose and three different molasses samples (labeled BS1, BS2 and HTM) obtained from the commercial processing of sugarcane into sugar, as shown in the following Table 6. The pH of all stocks was verified to be in the range of 6-6.6, and the stocks were then autoclaved.

[0332] Table 6. Molasses and sugar solutions.

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

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

[0333] Preparation of Invertase Solution: A 40 units/ml stock solution of invertase was prepared by reconstituting 1 mg of a 400 unit/mg Invertase (Sigma) in 10 milliliters of distilled water.

[0334] Experimental Conditions and Setup: 10 ml cultures were prepared, each consisting of 1% final molasses/sugar concentration, 0.05 units/ml Invertase, and 1.0e6 cells per ml of *Chlorella protothecoides* in a base Protease media. The cultures were numbered as follows: (1) media only control; (2) 1% HTM; (3) 1% BS1; (4) 1% BS2; (5) 1% glucose; and (6) 1% sucrose. A similar control set was also prepared without the addition of invertase. The cultures were grown in darkness for five days shaking at 250 rpm at 28°C.

[0335] Results: Growth of the *Chlorella protothecoides* cells was evaluated following the five days of incubation on the respective feedstock in darkness. As shown in Figures 19-20, the cells can be grown on molasses in the presence of a sucrose invertase with yields comparable to that of growth on pure glucose.

EXAMPLE 20

Generation of High-Oil and Low-Oil Biomass

[0336] Materials and Methods: *Chlorella protothecoides* #1 (STRAIN 250) biomass for transesterification was grown heterotrophically in the presence of glucose as a fixed carbon source as a fed-batch fermentation, essentially as described in *Appl Microbiol Biotechnol* 78:29–36 (2008). Sample "LO-1" was taken during exponential growth (at 60 hours) and contains an oil content similar to that obtained with photosynthetic growth. Sample "080020-1" was taken at 115 hours, after all nitrogen in the culture had been consumed and the culture had entered a steady state phase of lipid accumulation.

[0337] Lipid Content: Total lipid content of oil (pre-transesterifacation) was determined by HPLC analysis. Approximately 10 mg of dried biomass were mixed with 1 ml of isopropanol saturated with KOH and incubated at 80°C for 4 hours. Lipids from cell pellets were extracted and hydrolyzed using an isopropanol potassium hydroxide solution heated to 80°C for four hours. The extract samples were analyzed with an Aglient 1100 HPLC using the following method. The samples were derivatized with bromophenacyl bromide (60 mg/ml) and loaded onto a Luna 5u C8(2) 100A 150x2 mm column (Phenomenex). The samples were

eluted from the column using a gradient of water to 100% acetonitrile:tetrahydrofuran (95:5). Signals were detected using a DAD array detector at a wavelength of 254 nm.

[0338] Sample "LO-1" contained 8.6% oil, and sample "080020-1" contained 28% oil.

EXAMPLE 21

Direct Transesterification of Microbial Biomass

[0339] Sample Preparation: Wet pellets of biomass comprising low-oil content and high-oil content, respectively, prepared as described above, were lyophilized. Dried biomass from samples was ground to a coarse powder and dried again overnight at 55°C under vacuum. Percent moisture was determined to be <3% for each sample using a Mettler Toledo Moisture analyzer.

[0340] Transesterification: Anhydrous methanol/1N NaOH was added to dried biomass (<3% moisture) at a ratio of 1:5 in a screw cap glass bottle 4 times the volume of the biomass. A stir bar was placed in the bottle, which was then sealed tightly. The mixture was stirred vigorously at 55°C for 7 hours. The biomass was filtered through Whatmann filter paper and washed with methanol until filtrate was clear. All washes were combined in a balloon flask with original filtrate, and methanol was distilled off using a rotovap. Chloroform (1 part) was added and mixed well, and then poured into a separatory funnel. Methanol (2 parts) was then added to the flask, mixed well, and added to the separatory funnel. DI water (0.8 volume) was added to the flask, mixed, and added to the separatory funnel. The contents of the separatory funnel were shaken vigorously (with venting) and allowed to separate. The lower layer (chloroform/oil) was collected into a pre-weighed flask and fresh chloroform was added back to the funnel for a secondary extraction. The chloroform was then distilled off using the rotovap. Re-weighing the flask provided the yield determination. Lipid content was again determined by HPLC, as described above. Analytical measurements of the carotenoid constituents of the transesterified compositions were made using an HPLC method, as described by Schmid et al., *J of Applied Phycology* 7:487-494 (1995). Elemental analysis was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry.

[0341] Results: Table 7 shows the results of the transesterified product from low-oil (LO-1- 8.6% lipid) and high-oil (080020-1-28% lipid) biomass. All carotenoids are in mcg/g of lipophilic phase containing fatty acid methyl esters.

[0342] Table 7. Composition of transesterified low-oil and high-oil biomass.

	LO-1	080020-1	ASTM D6751 Specification
% oil of biomass	8.6	28	
% of oil converted to FAME (gram oil/gram dry cell wgt.)	9.3	30.5	

Element (ppm)			
Sulfur	121	52	15 ppm max
Phosphorus	784	<2	0.001% mass max
Magnesium	2	3	Ca + Mg: 5 ppm max
Calcium	4	<2	Ca + Mg: 5 ppm max
Iron	3	<2	
Zinc	40	12	
Sodium	190	15	Na + K: 15ppm max
Potassium	72	<2	Na + K: 15ppm max
Lutein (mcg/g)	469	35.5	
Zeaxanthin (mcg/g)	288	23.5	
α-Cryptoxanthin (mcg/g)	8.45	0.06	
β-Cryptoxanthin (mcg/g)	19.2	1.80	
α-Carotene (mcg/g)	1.96	0.08	
β-Carotene (mcg/g)	15.0	1.20	
Total Identified Carotenoids (mcg/g)	801	62.2	
Total Carotenoids (mcg/g)	1006	79.3	

EXAMPLE 22

Cultivation of Microalgae to Achieve High Oil Content

[0343] Microalgae strains were cultivated (cultured) to achieve a high percentage of oil by DCW. Cryopreserved cells were thawed at room temperature and 500 µl of cells were added to 4.5 ml of medium (4.2 g/L K_2HPO_4, 3.1 g/L NaH_2PO_4, 0.24 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g/L Citric Acid monohydrate, 0.025 g/L $CaCl_2$ $2H_2O$, 2 g/L yeast extract) plus 2% glucose and grown for 7 days at 28°C with agitation (200 rpm) in a 6-well plate. DCWs were determined by centrifuging 1 ml of culture at 14,000 rpm for 5 min in a pre-weighed Eppendorf tube. The culture supernatant was discarded and the resulting cell pellet washed with 1 ml of deionized water. The culture was again centrifuged, the supernatant discarded, and the cell pellets placed at -80°C until frozen. Samples were then lyophilized for 24 hrs and DCWs calculated. For determination of total lipid in cultures, 3 ml of culture were removed and subjected to analysis using an Ankom system (Ankom Inc., Macedon, NY) according to the manufacturer's protocol. Samples were subjected to solvent extraction with an Amkom XT10 extractor according to the manufacturer's protocol. Total lipid was determined as the difference in mass between acid hydrolyzed dried samples and solvent extracted, dried samples. Percent oil DCW measurements are shown in Table 8.

[0344] Table 8. Cultivation of microalgae to achieve high oil content.

Species	Strain	% Oil	Strain # (Figures 28 and 29a-i)
Chlorella kessleri	UTEX 397	39.42	4
Chlorella kessleri	UTEX 2229	54.07	5
Chlorella kessleri	UTEX 398	41.67	6
Parachlorella kessleri	SAG 11.80	37.78	7

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
Prototheca moriformis	UTEX 1435	27.17	12
Chlorella minutissima	UTEX 2341	31.39	13
Chlorella protothecoides	UTEX 250	34.24	1
Chlorella protothecoides	UTEX 25	40.00	2
Chlorella protothecoides	CCAP 211/8D	47.56	3
Chlorella sp.	UTEX 2068	45.32	14
Chlorella sp.	CCAP 211/92	46.51	15
Chlorella sorokiniana	SAG 211.40B	46.67	16
Parachlorella beijerinkii	SAG 2046	30.98	17
Chlorella luteoviridis	SAG 2203	37.88	18
Chlorella vulgaris	CCAP 211/11K	35.85	19
Chlorella reisiglii	CCAP 11/8	31.17	20
Chlorella ellipsoidea	CCAP 211/42	32.93	21
Chlorella saccharophila	CCAP 211/31	34.84	22
Chlorella saccharophila	CCAP 211/32	30.51	23

EXAMPLE 23

Genotyping of Microalgae with High Oil Content

[0345] Microalgae samples from the 23 strains listed in Table 8 above were genotyped. Genomic DNA was isolated from algal biomass as follows. Cells (approximately 200 mg) were centrifuged from liquid cultures 5 minutes at 14,000 x g. Cells were then resuspended in sterile distilled water, centrifuged 5 minutes at 14,000 x g and the supernatant discarded. A single glass bead ~2 mm in diameter was added to the biomass and tubes were placed at -80°C for at least 15 minutes. Samples were removed and 150 µl of grinding buffer (1% Sarkosyl, 0.25 M Sucrose, 50 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, RNase A 0.5 ug/ul) was added. Pellets were resuspended by vortexing briefly, followed by the addition of 40 µl of 5 M NaCl. Samples were vortexed briefly, followed by the addition of 66 µl of 5% CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) and a final brief vortex. Samples were next incubated at 65°C for 10 minutes after which they were centrifuged at 14,000 x g for 10 minutes. The supernatant was transferred to a fresh tube and extracted once with 300 µl of Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol 12:12:1, followed by centrifugation for 5 minutes at 14,000 x g. The resulting aqueous phase was transferred to a fresh tube containing 0.7 vol of isopropanol (~190 µl), mixed by inversion and incubated at room temperature for 30 minutes or overnight at 4°C. DNA was recovered via centrifugation at 14,000 x g for 10 minutes. The resulting pellet was then washed twice with 70% ethanol, followed by a final wash with 100% ethanol. Pellets were air dried for 20-30 minutes at room temperature followed by resuspension in 50 µl of 10mM TrisCl, 1mM EDTA (pH 8.0).

[0346] Five µl of total algal DNA, prepared as described above, were diluted 1:50 in 10 mM Tris, pH 8.0. PCR reactions, final volume 20 µl, were set up as follows. Ten µl of 2 x iProof HF master mix (BIO-RAD) was added to 0.4 µl primer SZ02613 (5'-TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC-3' (SEQ ID NO:1) at 10 mM stock concentration). This primer sequence runs from position 567-588 in Gen Bank accession no. L43357 and is highly conserved in higher plants and algal plastid genomes. This was followed by the addition of 0.4 µl primer SZ02615 (5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (SEQ ID NO:2) at 10 mM stock concentration). This primer sequence is complementary to position 1112-1093 in Gen Bank accession no. L43357 and is highly conserved in higher plants and algal plastid genomes. Next, 5 µl of diluted total DNA and 3.2 µl dH_2O were added. PCR reactions were run as follows: 98°C, 45''; 98°C, 8''; 53°C, 12''; 72°C, 20'' for 35 cycles followed by 72°C for 1 min and holding at 25°C. For purification of PCR products, 20 µl of 10 mM Tris, pH 8.0, was added to each reaction, followed by extraction with 40 µl of Phenol:Chloroform:isoamyl alcohol 12:12:1, vortexing and centrifuging at 14,000 x g for 5 minutes. PCR reactions were applied to S-400 columns (GE Healthcare) and centrifuged for 2 minutes at 3,000 x g. Purified PCR products were subsequently TOPO cloned into PCR8/GW/TOPO and positive clones selected for on LB/Spec plates. Purified plasmid DNA was sequenced in both directions using M13 forward and reverse primers. Sequence alignments and unrooted trees, were generated using Geneious DNA analysis software, are shown in Figures 29a-29i. Sequences from strains 1-23 (designated in Example 22, Table 8) are listed as SEQ ID NOs:7-29 in the attached Sequence Listing.

EXAMPLE 24

Diversity of Lipid Chains in Algal Species

[0347] Cultures of various species of algae were maintained, and all experiments were carried out in Modified Protease media, as described above in EXAMPLE 2. For each strain, 10 ml cultures were setup in 50 ml flasks as follows:

1. Proteose growth media with no carbon addition;
2. Proteose growth media with 1% glucose.

[0348] Each strain was grown in the two conditions described above, at an initial seeding density of 1.0 x 10^6 cells/ml. The cultures were kept in the dark and agitated at 250 rpm for 7 days. The cells were harvested after a 7 day growth period, and assessed for growth in the dark relative to the control by measuring dried cell weight. DCWs were determined as follows: One ml of culture was centrifuged and the resulting pellet was rinsed with water to

remove any salt or residual media; the final, rinsed pellet was frozen at -80 degree C; and subjected to freeze drying overnight in a Freeze Dry System (Labconco, MO, USA). All species listed in Table 9 below grew on glucose as a carbon source in the dark. No cells grew in the absence of glucose (condition 1). Glycerolipid profile was determined as described in Example 20.

[0349] Table 9. Glycerolipid profiles of various algal species.

Species	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%	54.9%	4.6%
Chlorella kessleri	15.6%	0.0%	4.0%	26.2%	26.6%	23.0%	4.6%
Chlorella trebouxiodes	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%

[0350] Lipid samples from a subset of strains grown as described in Example 22, and shown in Table 8, were also analyzed for lipid profile using HPLC. Results are shown in Figure 29.

EXAMPLE 25

Saponification of High-Oil *Chlorella protothecoides* Biomass

[0351] Biomass having a high-oil content is generated and analyzed according to the method described in Example 20. The biomass comprises 45% lipid, 20% carbohydrates, 10% protein, 10% other cellular constituents, 10% water, and 5% salts. In an embodiment, the biomass can comprise dried whole algal cells comprising lipid globules suspended in a partially dehydrated cell mass.

[0352] Preparation of a Liquid Cellular Soap: The biomass identified above is dispersed in water to form an oil-in-cell emulsion concentrate. An excess of KOH sufficient to convert the desired amount of glycerolipids and fatty acid esters to fatty acid salts is then dissolved in the aqueous solution comprising the biomass. The mixture is then stirred to facilitate completion of the alkaline hydrolysis reaction, and heated to a temperature between 80-90°C for from 30 minutes to 12 hours to complete the conversion of lipids to fatty acid salts. Water lost to evaporation is replaced as necessary throughout the reaction process. Various additives can be combined with the saponified composition, including glycerin (for clarity and to impart a moisturizing characteristic), ethylenediamine (EDTA, a chelating agent to enhance performance when used in hard water conditions), cocoamidopropyl betaine (an amphoteric surfactant used to impart cleansing and rinsing properties), and a fragrance to produce a soap

product. In some embodiments, the soap product comprises a cellular soap with components as shown in Table 10 below.

[0353] Table 10. Components of cellular soap made directly from biomass.

Component	Quantity
Biomass (Whole Cells)	10-60%
KOH	1-5%
Glycerin	5-25%
Fragrance	1-2%
EDTA	1-5%
Water	to 100%

[0354] The cellular soaps described in this example include natural hydrating and skin softening characteristics imparted by the presence of carbohydrates and proteins from the algal cells, as well as antioxidant properties derived from the incorporation of algal carotenoids and other compounds into the composition.

[0355] Alternatively, an organic base such as triethanolamine can be used in the alkaline hydrolysis reaction to produce a clearer product. The use of triethanolamine or another organic base will also generally produce a milder product, less likely to cause irritation to skin when used as a cleanser.

[0356] Optionally, the fatty acid salts can be precipitated from the mixture by addition of NaCl or KCl salts, and separated for use in compositions in combination with various additives as described herein.

[0357] Figure 20 shows a micrograph of soap made with 48% oil DCW *Chlorella protothecoides* biomass. The soap contained 10% w/w algal biomass.

EXAMPLE 26

Saponification of Hexane-Extracted Oil from *Chlorella protothecoides* Biomass

[0358] Biomass is generated according to the method described in Example 20. Conventional hexane extraction of the lipids from the biomass is performed. The hexane extracted lipids are then saponified by mixing the lipids with an aqueous solution of NaOH or KOH containing an amount of base sufficient to convert the desired amount of lipid to fatty acid salts, and optionally heating the mixture to expedite the reaction. The fatty acid salts are then precipitated by addition of NaCl or KCl. Compositions of saponified oils derived from hexane-extracted biomass contain higher proportions of contaminating carotenoids due to the efficiency with which hexane extracts such compounds from the microbial biomass.

EXAMPLE 27

Saponification of Solventless-Extracted Oil from *Chlorella protothecoides* Biomass

[0359] Biomass is generated according to the method described in Example 20. A solventless extraction of the lipids from the biomass is performed by lysis and pressing of the biomass through the use of physical pressure. The extracted lipids are then saponified by mixing the lipids with an aqueous solution of NaOH or KOH containing an amount of base sufficient to convert the desired amount of lipid to fatty acid salts, and optionally heating the mixture to expedite the reaction. The fatty acid salts are then precipitated by addition of NaCl or KCl. Compositions of saponified oils derived from hexane-extracted biomass contain relatively lower proportions of contaminating carotenoids, as compared to hexane-extracted lipids, due to the decreased efficiency with which such compounds are extracted from the microbial biomass using the solventless procedure.

EXAMPLE 28

Glycerolipid Profile of *Prototheca* Strains

[0360] Five *Prototheca* strains were cultivated in media with 2% glucose and grown for 7 days at 28°C with agitation (200 rpm) in a 6-well plate. Lipid profiles were determined using standard HPLC methods. The lipid profile for a particular strain did not change significantly when grown in different culture media. The results are shown in Table 11, below.

[0361] Table 11. Glycerolipid profile of *Prototheca* strains.

Origin	Species	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%
UTEX 1439	Prototheca moriformis	0%	0%	0%	27%	0%	3%	57%	13%	0%
UTEX 1441	Prototheca moriformis	0%	0%	1%	28%	1%	3%	54%	12%	1%
UTEX 1435	Prototheca moriformis	0%	0%	1%	26%	0%	3%	55%	12%	2%
UTEX 1437	Prototheca moriformis	0%	0%	0%	25%	0%	2%	57%	12%	3%

[0362] Biomass from UTEX 1435 was subjected to hexane extraction. The extracted oil contained very little coloration. Figure 19 shows a sample of the UTEX 1435 oil in comparison to oil from *Chlorella protothecoides* UTEX 250.

EXAMPLE 29

Carotenoid and Chlorophyll Analysis of Oil Extracted from *Prototheca moriformis* UTEX 1435

[0363] Hexane extracted oil from *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) biomass was generated according to methods described in Example 26 above and was analyzed for

carotenoids and chlorophyll using HPLC. Overall, the carotenoid levels were much lower than the carotenoid levels in oils described in Table 7 above. Additionally, the chlorophyll content of the oil was less than 0.01mg/kg. This result is consistent with the results shown in Figure 19, with the extracted oil from UTEX 1435 biomass having very little coloration. The carotenoid and chlorophyll analysis for oil extracted from UTEX 1435 biomass is summarized in Table 12, below.

[0364] Table 12. Carotenoid analysis of oil extracted from *Prototheca moriformis* UTEX 1435.

Lutein	0.382 mcg/g
Zeaxanthin	1.23 mcg/g
cis-Lutein/Zeaxanthin	0.446 mcg/g
alpha-Cryptoxanthin	none detected
beta-Cryptoxanthin	none detected
Lycopene	none detected
alpha-Carotene	0.057 mcg/g
beta-Carotene	0.127 mcg/g
cis-beta-Carotene	0.069 mcg/g
Phytofluene	0.696 mcg/g
Phytoene	0.689 mcg/g
Total Identified Carotenoids	3.70 mcg/g
Chlorophyll	<0.01 mg/kg

EXAMPLE 30

Genomic DNA Analysis of 23S rRNA from 8 Strains of *Chlorella protothecoides*

[0365] Genomic DNA from 8 strains of *Chlorella protothecoides* (UTEX 25, UTEX 249, UTEX 250, UTEX 256, UTEX 264, UTEX 411, CCAP 211/17, and CCAP 211/8d) was isolated and genomic DNA analysis of 23S rRNA was performed according to the methods described in Example 23, above.

[0366] All strains of *Chlorella protothecoides* tested were identical in sequence except for UTEX 25. Results are summarized in the Cladogram shown in Figures 21a-21c. Sequences for all eight strains are listed as SEQ ID NOs:3-4 in the attached Sequence Listing.

[0367] The 23s rRNA genomic sequence for *Prototheca moriformis* UTEX 1436 (SEQ ID NO:5) was also compared to other *Prototheca* species and *Chlorella protothecoides*. The comparison showed that the 23s rRNA genomic sequence for *Prototheca moriformis* UTEX 1436 was dissimilar to the other *Prototheca* genotypes (SEQ ID NO:6).

EXAMPLE 31

Sorghum Utilization Screen

[0368] Strains: The following strains were used in the screen for identifying microalgae strains capable of utilizing sorghum as a sole carbon source: 10 strains were *Chlorella protothecoides* (UTEX 25, UTEX 31, UTEX 411, CCAP 221/8D, UTEX 249, UTEX 250, UTEX 256, UTEX 264, SAG 211-10D, and CCAP 211/17). 6 strains were *Prototheca moriformis* (UTEX 1435, UTEX 1437, UTEX 288, UTEX 1439, UTEX 1441 and UTEX 1434. Other strains included *Chlorella luteoviridis* (UTEX 22 and SAG 2214), *Chlorella kessleri* (UTEX 2229), *Parachlorella kessleri* (SAG 12.80) and *Prototheca stagnora* (UTEX 1442).

[0369] Culture Conditions: Seed cultures of the microalgal strains (identified above) were started as 1 ml liquid cultures in 24 well plates and were grown autotrophically for 48 hours in light, agitating at ~350 rpm. Pure sorghum was purchased from Maasdam Sorghum Mills (Lynnville, Iowa) with a sugar profile of fructose 21.0% w/w, dextrose 28.0% w/w, sucrose 16.0% w/w and maltose <0.5% w/w. The cultures were then transferred to liquid medium containing 2%, 5% or 7% (v/v) pure sorghum (diluted from the pure stock) as the sole carbon source and the cultures were then grown heterotrophically in the dark, agitating at ~350rpm. Samples from the cultures were pulled at 24, 40, 48, 67 and 89 hours and growth was measured using A750 readings on a spectrophotometer. Growth was observed for each of the strains tested, as shown in Figures 22-27.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of chemically modifying lipid-containing microbial biomass comprising:

(a) culturing a population of microbes;

(b) harvesting microbial biomass, wherein the biomass contains at least 5% lipid by dry cell weight; and

(c) subjecting the biomass to a chemical reaction that covalently modifies at least 1% of the lipid.

2. The method of claim 1, further comprising separating the covalently modified lipid from other components of the biomass.

3. The method of claim 2, wherein separating comprises a phase separation whereby the covalently modified lipids form a light non-aqueous phase and components of the biomass form one or more heavier phases.

4. The method of claim 1, wherein the biomass is subjected to the chemical reaction without a step of prior enrichment that increases the ratio of the lipids to the non-lipid material by more than 50% by weight.

5. The method of claim 1, wherein the harvested biomass is not subjected to treatments other than removing water or lysis before the chemical reaction.

6. The method of claim 1, wherein the biomass is subject to the chemical reaction with a step of prior enrichment that increases the ratio of the lipids to the dry weight of the microbes.

7. The method of claim 1, wherein step (c) comprises transesterifying the biomass to generate a lipophilic phase containing fatty acid alkyl esters and a hydrophilic phase containing cell material and glycerol.

8. The method of claim 1, further comprising removing water from the biomass prior to subjecting the biomass to the chemical reaction.

9. The method of claim 1, wherein step (c) includes contacting the biomass with an enzyme to catalyze the chemical reaction.

10. The method of claim 1, wherein the harvested biomass comprises a lipid content of at least 30% by dry cell weight.

11. The method of claim 1, further comprising separating a lipophilic phase containing the covalently modified lipids from hydrophilic cell material of the biomass.

12. The method of claim 1, wherein the microbes are selected from the group consisting of bacteria, cyanobacteria, eukaryotic microalgae, oleaginous yeast, and fungi.

13. The method of claim 10, wherein the microbes are selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1 and the microalgae that have at least 85% 23S rRNA genomic sequence identity to one or more sequences from the group consisting of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:29; the oleaginous yeast listed in Table 2; and the fungi listed in Table 3.

14. The method of claim 12, wherein the microbes are a species of the genus *Chlorella, Parachlorella* or *Prototheca.*

15. The method of claim 11, wherein the amount of calcium and magnesium combined by weight in the lipophilic phase is no greater than 5 parts per million, wherein the amount of phosphorous in the lipophilic phase is no greater than 0.001%, by mass, the amount of sulfur in the lipophilic phase is no greater than 15 parts per million, wherein the amount of potassium and sodium combined by weight in the lipophilic phase is no greater than 5 parts per million, and/or wherein the total carotenoid content of the lipophilic phase is no greater than 100 micrograms of carotenoid per gram.

16. The method of claim 11, further comprising disrupting the biomass prior to transesterifying the biomass.

17. The method of claim 1, wherein two distinct strains or species of microbes are separately cultured and biomass from both cultures is mixed prior to step (c).

18. The method of claim 17, wherein at least two the distinct strains of microbes have different glycerolipid profiles.

19. The method of claim 1, wherein step (c) is selected from the steps of hydrogenating the biomass to at least partially saturate unsaturated bonds in the lipid, interesterifying the biomass to generate a mixture of glycerolipids having a modified arrangement of fatty acid constituents relative to the lipid in the harvested biomass, hydroxylating the biomass to generate hydroxylated lipids, esterifying at least a portion of the

hydroxylated lipids to generate estolides, hydrolyzing the biomass to generate free fatty acids from the lipid.

20. The method of claim 1, wherein step (c) comprises:

(i) deoxygenation at elevated temperature in the presence of hydrogen in the presence of a catalyst;

(ii) isomerization in the presence of hydrogen in the presence of a catalyst; and

(iii) removal of gases and naphtha compounds.

21. The method of claim 1, wherein step (c) comprises saponifying the biomass to generate fatty acid salts from the lipid.

22. A composition containing more than one phase comprising: (a) a lighter phase containing fatty acid alkyl esters; and at least one heavier phase containing microbial biomass.

23. The composition of claim 22, wherein the microbial biomass is selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1, the oleaginous yeast listed in Table 2, the fungi listed in Table 3.

24. The composition of claim 23, wherein the amount of calcium and magnesium combined by weight in the lightest phase is no greater than 5 parts per million, wherein the amount of phosphorous in the lightest phase is no greater than 0.001%, by mass, wherein the amount of sulfur in the lightest phase is no greater than 15 parts per million, wherein the amount of potassium and sodium combined by weight in the lightest phase is no greater than 5 parts per million, and/or wherein the total carotenoid content of the lightest phase is no greater than 100 micrograms of carotenoid per gram.

25. A composition containing more than one phase selected from the group of compositions comprising: a composition having a lighter phase containing completely saturated lipids and at least one heavier phase containing microbial biomass; a composition having a lighter phase containing lipids and at least one heavier phase containing microbial biomass from more than one species or strain; a composition having a lighter phase containing hydroxylated lipids and at least one heavier phase containing microbial biomass; and a composition having a lighter phase containing free fatty acids and a heavier phase containing microbial biomass.

26. A method of making a soap, comprising:

(a) culturing a population of microbes;

(b) harvesting microbial biomass, wherein the biomass contains at least 5% lipid by DCW, including glycerolipids or fatty acid esters; and

(c) subjecting the biomass to an alkaline hydrolysis reaction to produce a soap from the chemical conversion of at least a portion of the glycerolipids or fatty acid esters to fatty acid salts.

27. The method of claim 26, further comprising substantially separating the fatty acid salts from other components of the biomass.

28. The method of claim 26, wherein the microbes are selected from the group consisting of the microalgae listed in Table 1, the oleaginous yeast listed in Table 2, and the fungi listed in Table 3.

29. The method of claim 26, wherein two distinct strains or species of microbes are separately cultured and biomass from both cultures is mixed prior to step (c).

30. The method of claim 29, wherein at least two of the distinct strains of microbes have different glycerolipid profiles.

31. A composition comprising saponified oil derived from the alkaline hydrolysis of biomass or extracted oil produced by culturing a population of microbes.

32. The composition of claim 31, wherein the composition further comprises at least one oil selected from soy, rapeseed, canola, palm, palm kernel, coconut, corn, waste vegetable, Chinese tallow, olive, sunflower, cotton seed. chicken fat, beef tallow, porcine tallow, microalgae, macroalgae, Cuphea, flax, peanut, choice white grease, lard, Camelina sativa, mustard seed cashew nut, oats, lupine, kenaf, calendula, hemp, coffee, linseed (flax), hazelnut, euphorbia, pumpkin seed, coriander, camellia, sesame, safflower, rice, tung oil tree, cocoa, copra, pium poppy, castor beans, pecan, jojoba, jatropha, macadamia, Brazil nuts, avocado, a fossil oil or a distillate fraction thereof, and optionally one or more additives selected from the group consisting of essential oils, fragrance oils, flavor oils, botanicals, extracts, CO_2 extracts, clays, colorants, titanium dioxide, micas, tinting herbs, glitters, exfoliants, fruit seeds, fibers, grain powders, nut meals, seed meals, oil beads, wax beads, herbs, hydrosols, vitamins, milk powders, preservatives, antioxidants, tocopherols, salts, sugars, vegetable oils, waxes, glycerin, sea vegetables, nutritive oils, moisturizing oils, vegetable butters, propylene glycol, parabens, honey, bees wax, aloe, polysorbate, cornstarch, cocoa powder, coral powder, humectants, gums, emulsifying agents, and thickeners.

33. The composition of claim 31, wherein the microbes are selected from the group consisting of bacteria, cyanobacteria, eukaryotic microalgae, oleaginous yeast and fungi.

34. The composition of claim 33, wherein the microbes are a species of the genus *Chlorella, Parachlorella* or *Prototheca*.

35. The composition of claim 31, wherein the biomass or extracted oil comprises a mixture of biomass or a mixture of extracted oils from two distinct strains or species of microbes that have been separately cultured.

36. The composition of claim 35, wherein at least two of the distinct strains of microbes have different glycerolipid profiles.

37. The composition of claim 31, wherein components derived from the biomass or extracted oil constitute at least 50% of the composition's total mass.

38. The composition of claim 31, comprising less than 50 micrograms carotenoid per gram of saponified oil.

39. The composition of claim 31, wherein the saponified oil is saponified from fatty acid esters comprising at least 10% C16.

40. The composition of claim 31, comprising less than 0.1mg/kg chlorophyll.

41. A composition comprising an oil extracted from microalgae, wherein the oil contains less than 0.01 mg/kg chlorophyll.

42. The composition of claim 41, wherein the microalgae is of the genus *Prototheca*.

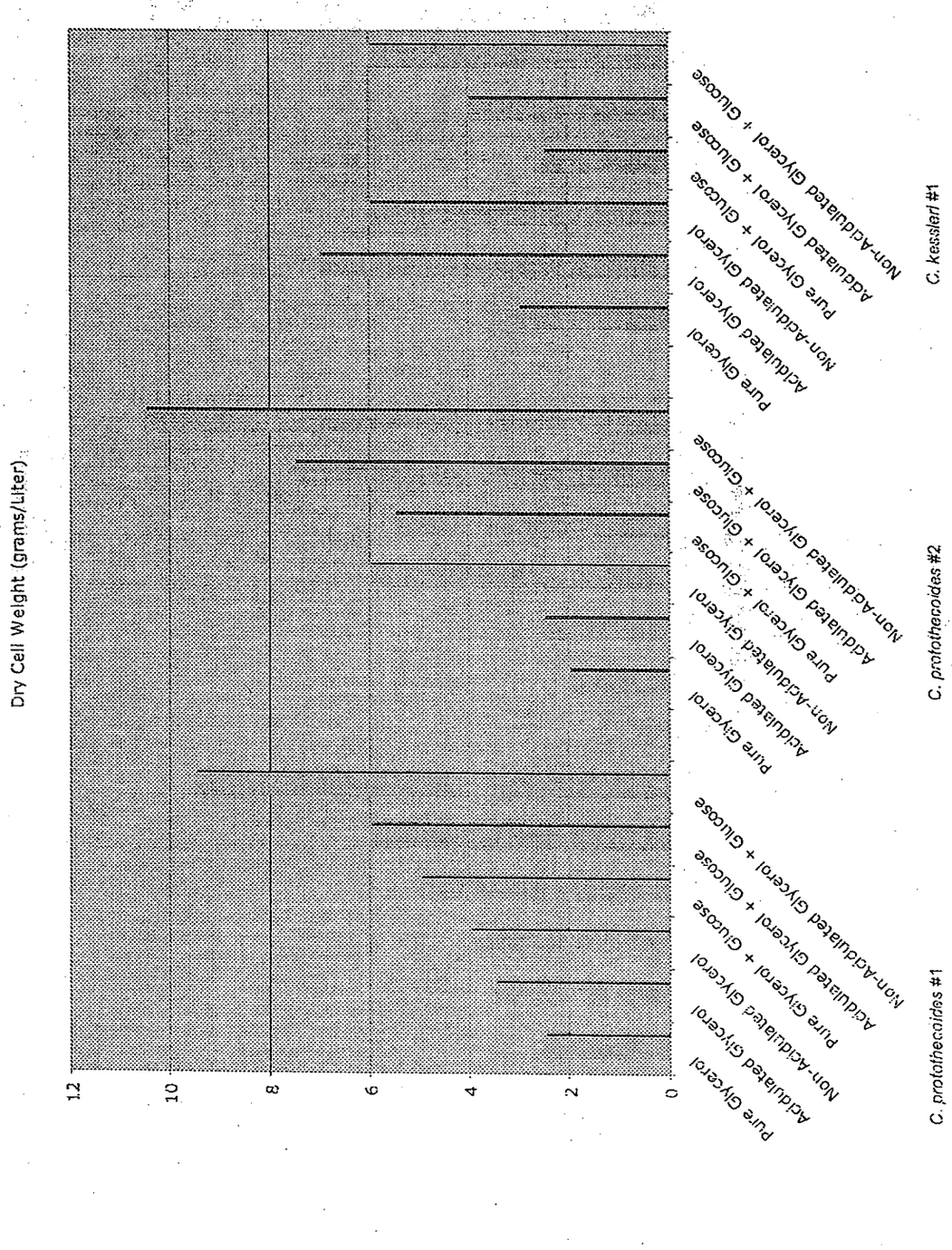
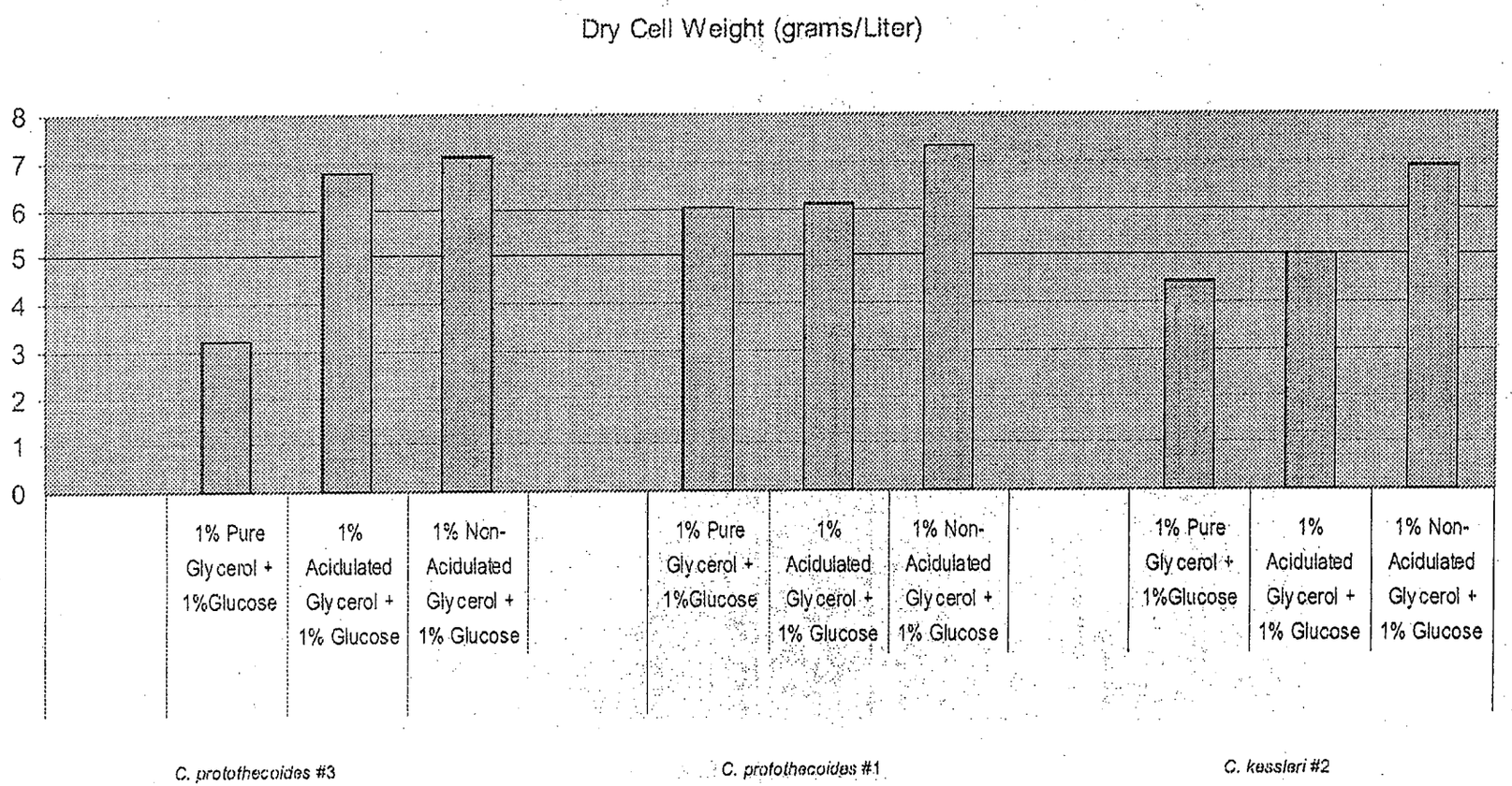

Dry Cell Weight (grams/Liter)
12
10
8
6
4
2
0
Pure Glycerol
Acidulated Glycerol
Non-Acidulated Glycerol
Pure Glycerol + Glucose
Acidulated Glycerol + Glucose
Non-Acidulated Glycerol + Glucose
C. protothecoides #1
C. protothecoides #2
C. kessleri #1

Figure 1

Figure 2


Dry Cell Weight (grams/Liter)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1% Pure Glycerol + 1%Glucose
1% Acidulated Glycerol + 1% Glucose
1% Non-Acidulated Glycerol + 1% Glucose
1% Pure Glycerol + 1%Glucose
1% Acidulated Glycerol + 1% Glucose
1% Non-Acidulated Glycerol + 1% Glucose
1% Pure Glycerol + 1%Glucose
1% Acidulated Glycerol + 1% Glucose
1% Non-Acidulated Glycerol + 1% Glucose
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1
C. kessleri #2

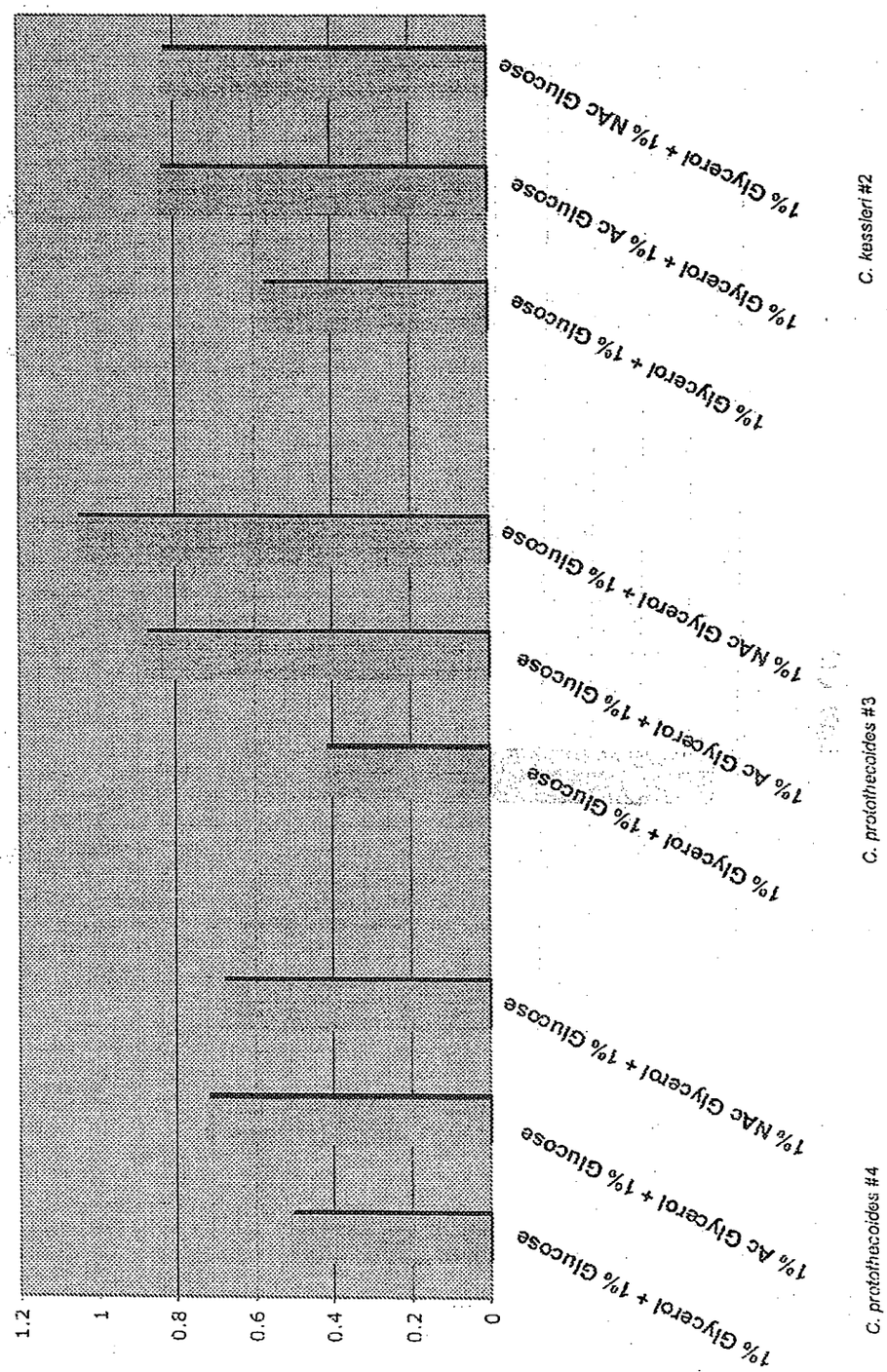

Lipid OD 530nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1% Glycerol + 1% NAc Glucose
1% Glycerol + 1% Ac Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
C. kessleri #2
C. protothecoides #3
C. protothecoides #4

Figure 3

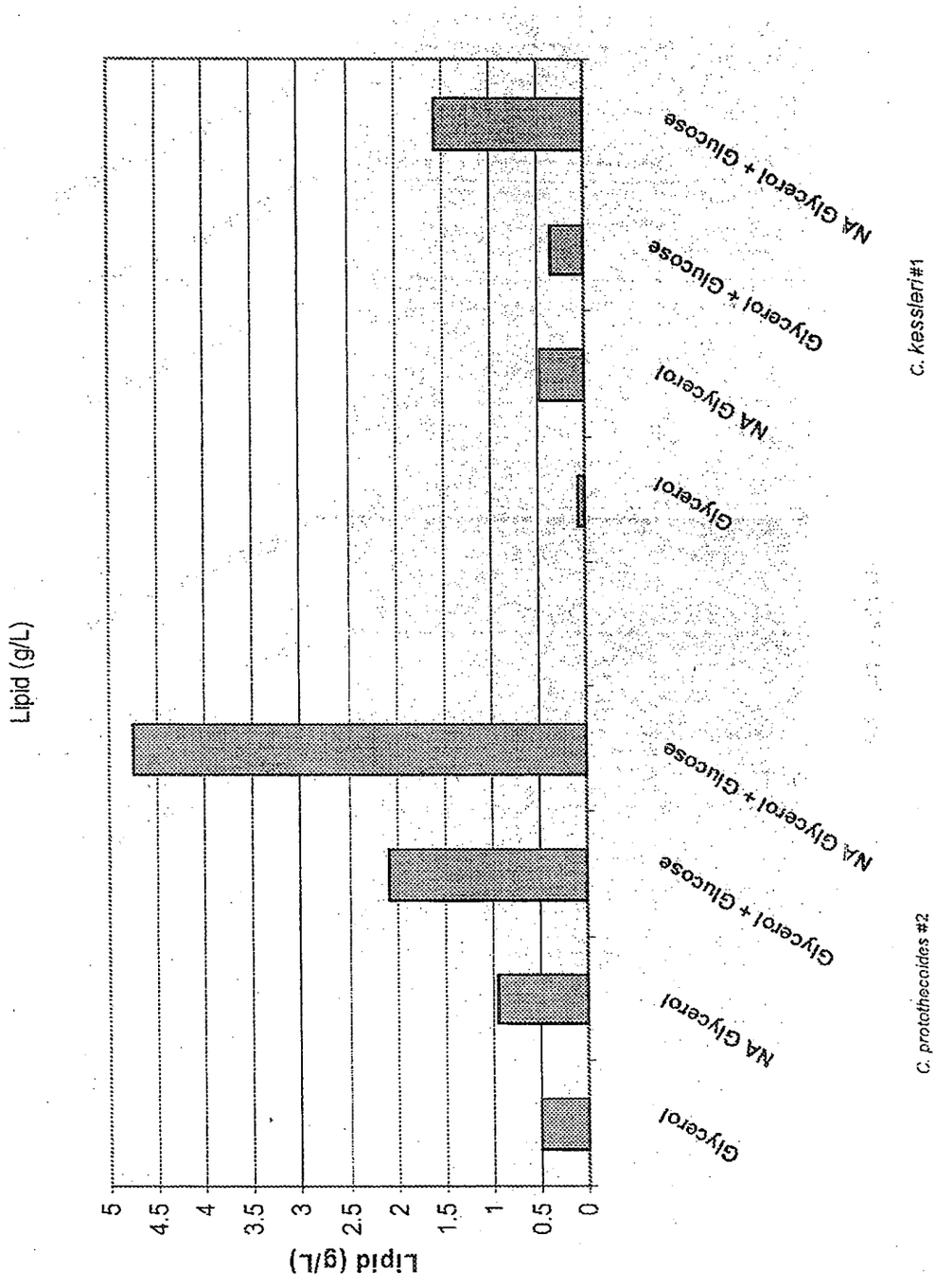
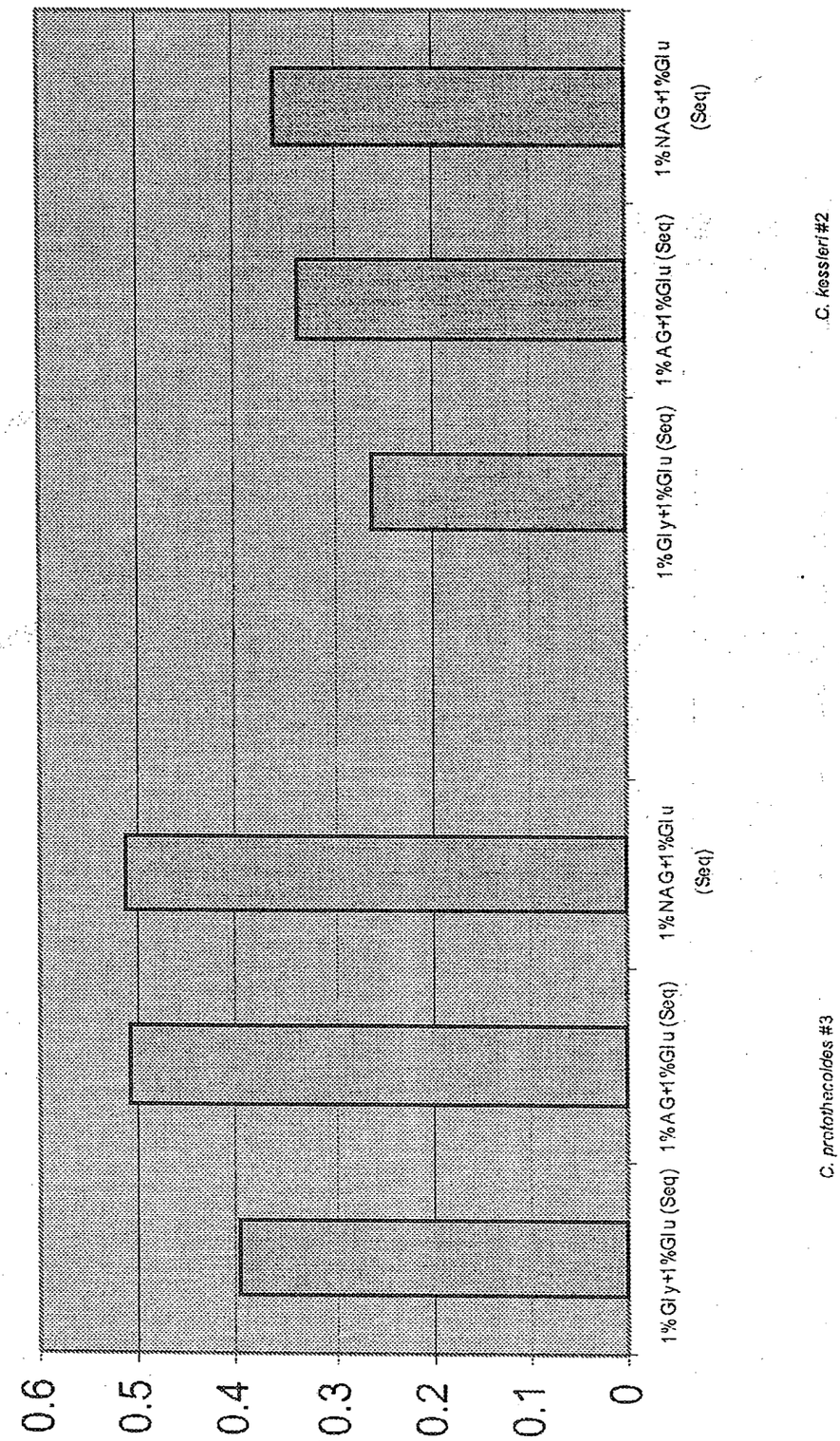

Lipid (g/L)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Lipid (g/L)
Glycerol
NA Glycerol
Glycerol + Glucose
NA Glycerol + Glucose
C. protothecoides #2
Glycerol
NA Glycerol
Glycerol + Glucose
NA Glycerol + Glucose
C. kessleri#1

Figure 4

Figure 5


% Lipid
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1% Gly+1%Glu (Seq)
1%AG+1%Glu (Seq)
1%NAG+1%Glu (Seq)
C. protothecoides #3
1% Gly+1%Glu (Seq)
1%AG+1%Glu (Seq)
1%NAG+1%Glu (Seq)
C. kessleri #2

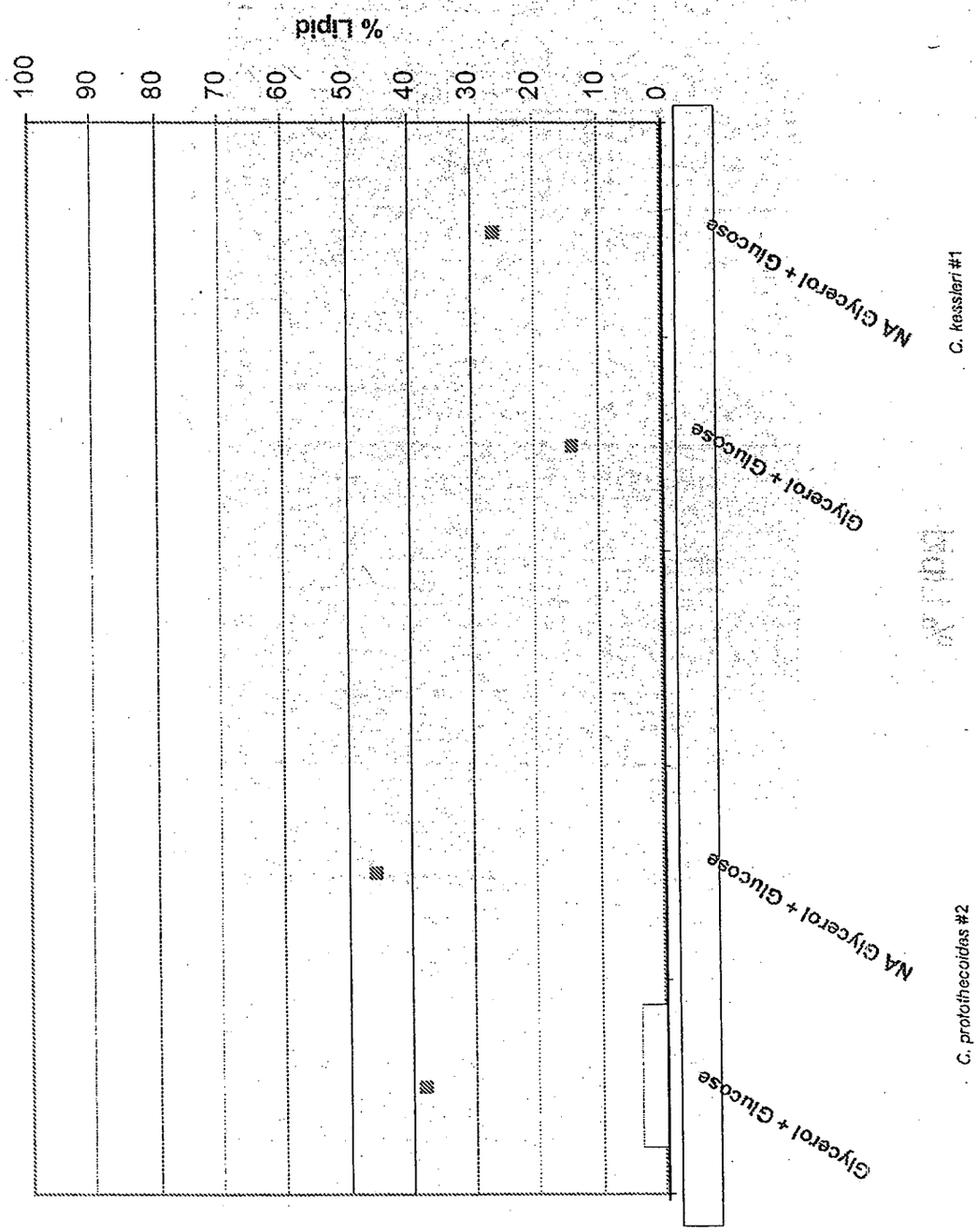

% Lipid
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
NA Glycerol + Glucose
Glycerol + Glucose
NA Glycerol + Glucose
Glycerol + Glucose
C. kessleri #1
C. protothecoidas #2

Figure 6

Figure 7

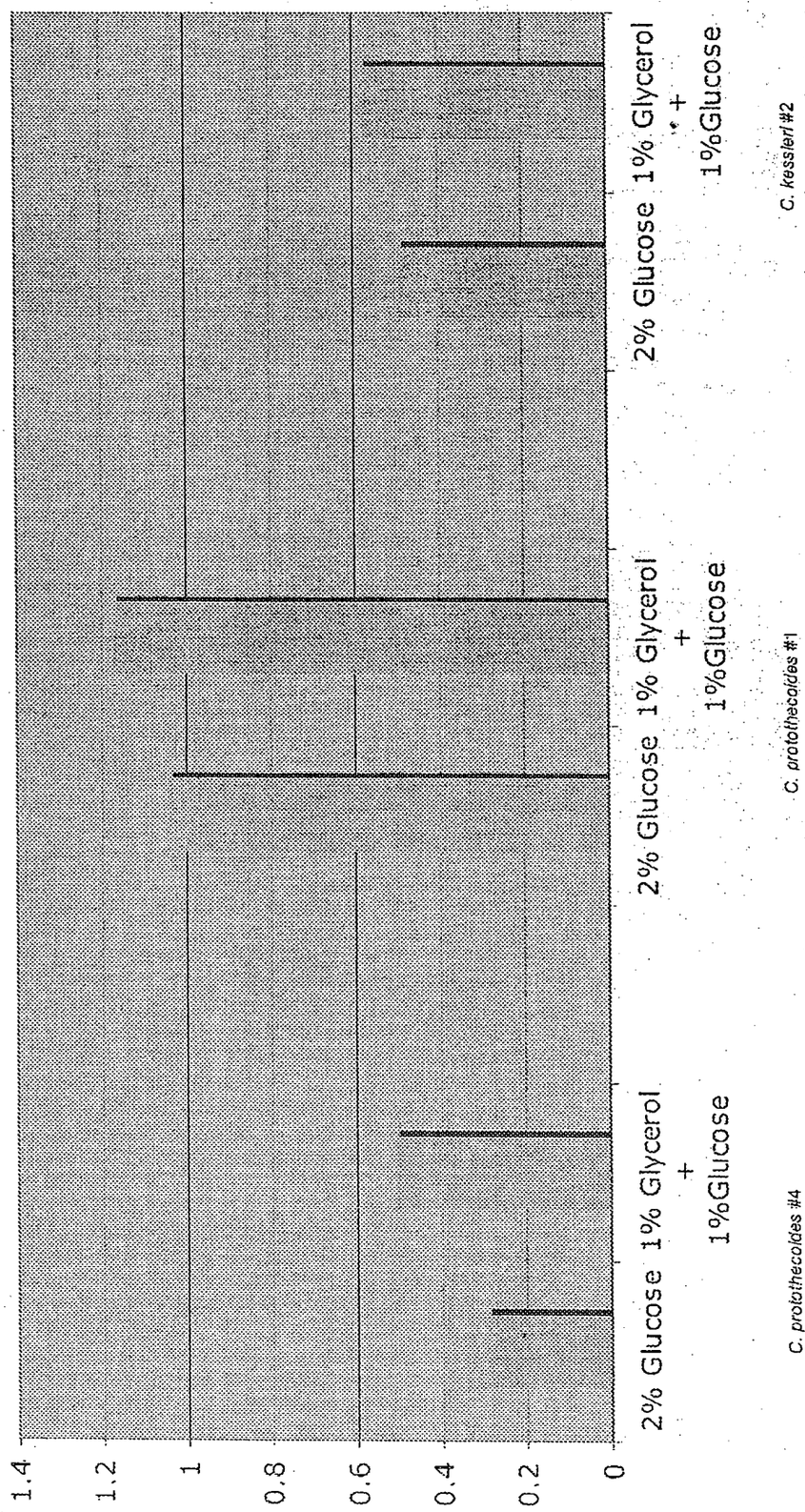

Lipid OD 530nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2% Glucose 1% Glycerol + 1%Glucose
2% Glucose 1% Glycerol + 1%Glucose
2% Glucose 1% Glycerol + 1%Glucose
C. protothecoides #4
C. protothecoides #1
C. kessleri #2

Figure 8

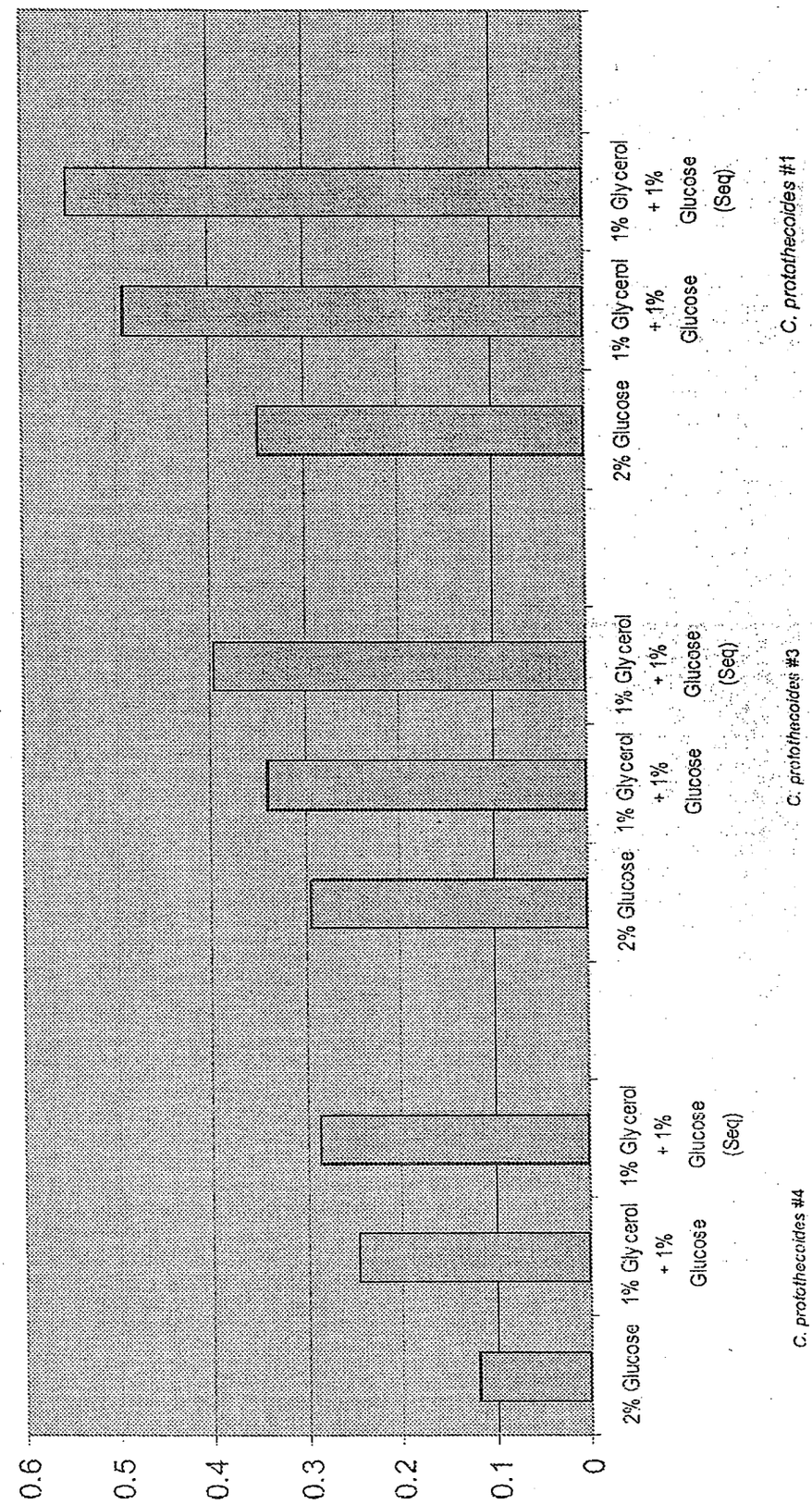
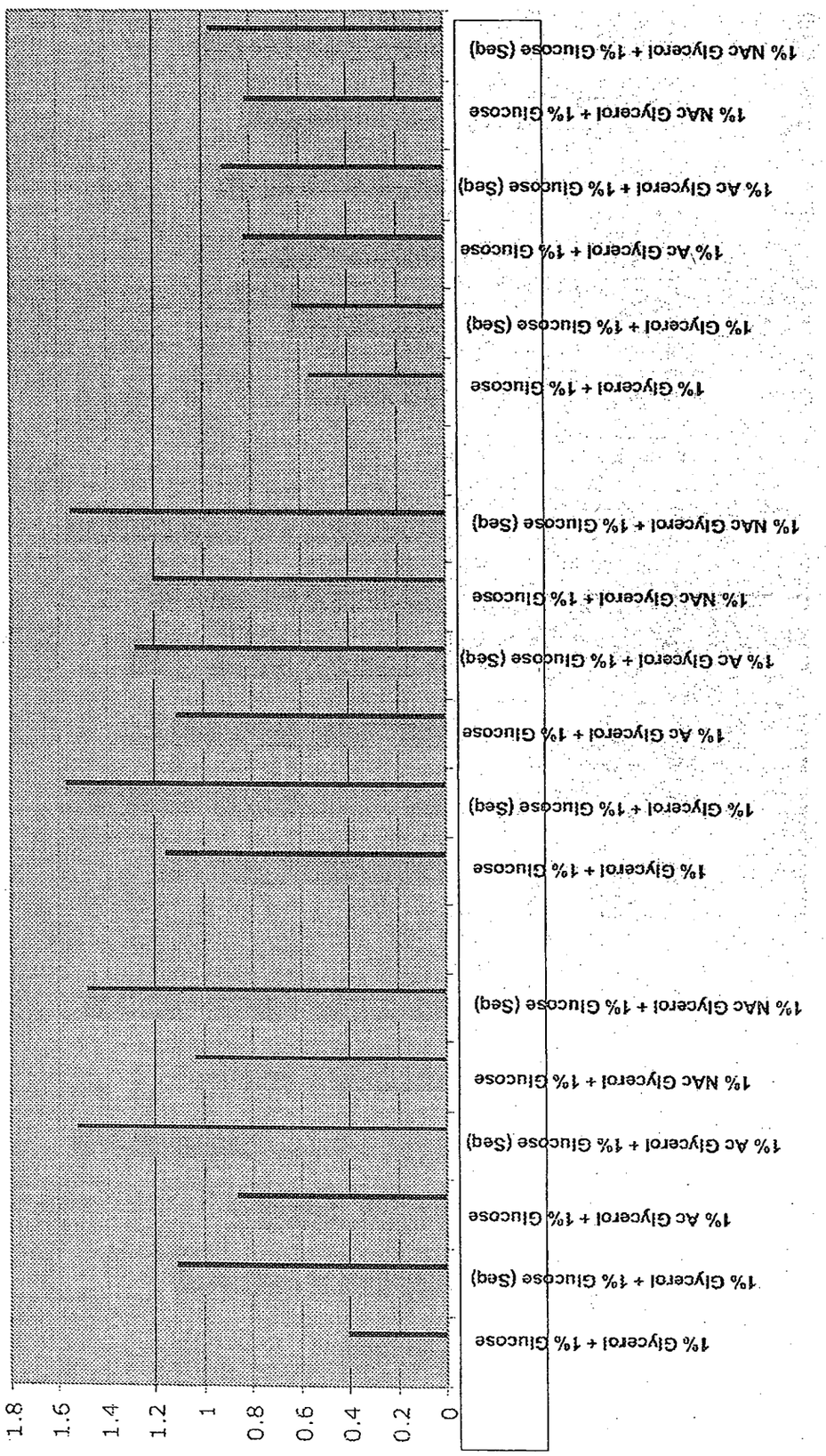

% Lipid
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
C. protothecoides #4
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1

Figure 9


Lipid OD 530nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Sed)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Sed)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Sed)
C. prototheocoides #3
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Sed)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Sed)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Sed)
C. prototheocoides #1
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Sed)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Sed)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Sed)
C. kessleri #2

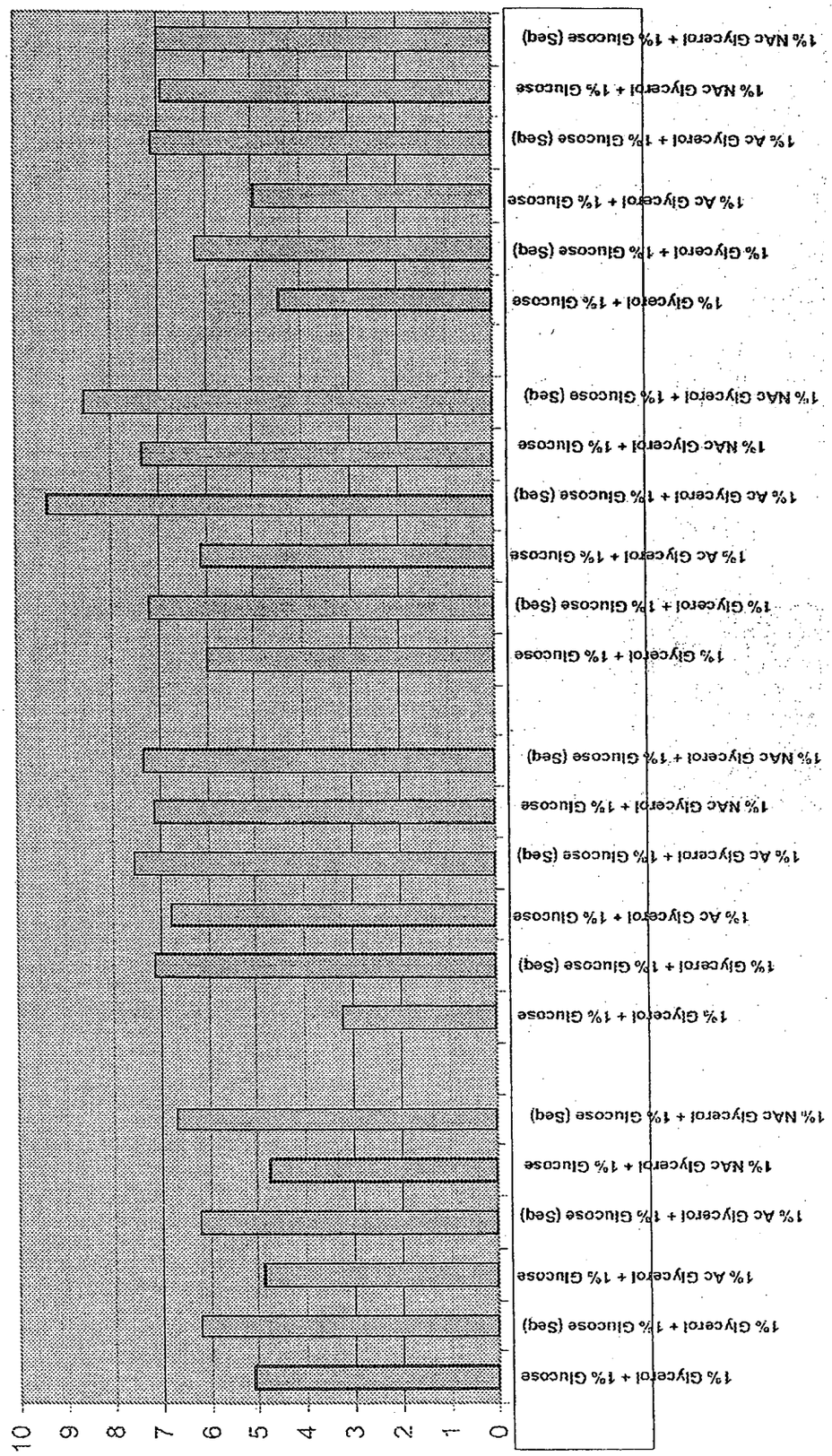
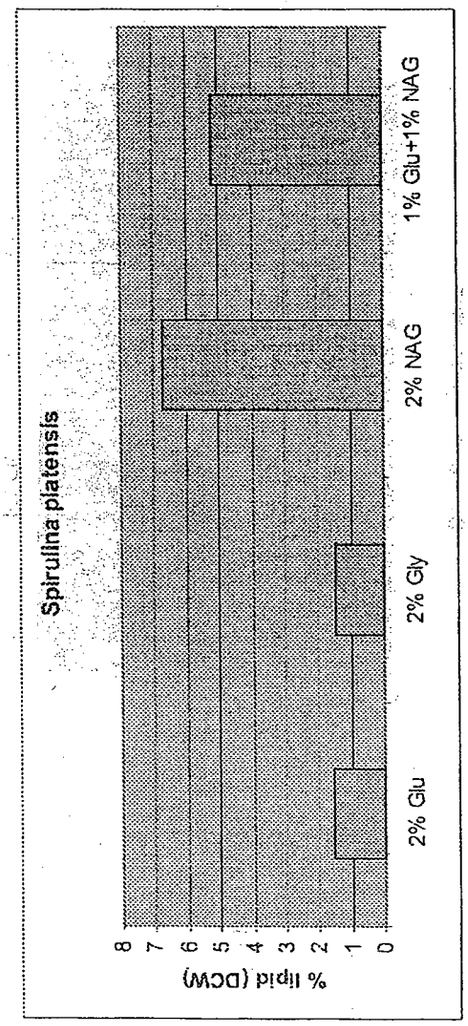
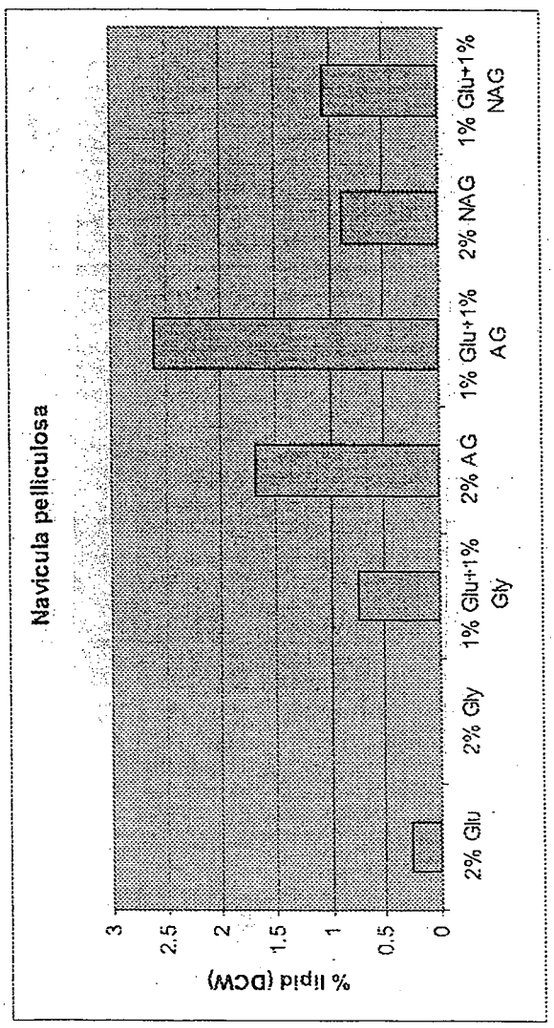

Dry Cell Weight (grams/Liter)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Seq)
C. protothecoides #4
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Seq)
C. protothecoides #3
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Seq)
C. protothecoides #1
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose (Seq)
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose (Seq)
C. kessleri #2

Figure 10


Spirulina platensis
% lipid (DCW)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
2% Glu
2% Gly
2% NAG
1% Glu+1% NAG

(a)


Navicula pelliculosa
% lipid (DCW)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
2% Glu
2% Gly
1% Glu+1% Gly
2% AG
1% Glu+1% AG
2% NAG
1% Glu+1% NAG

(b)

Figure 11

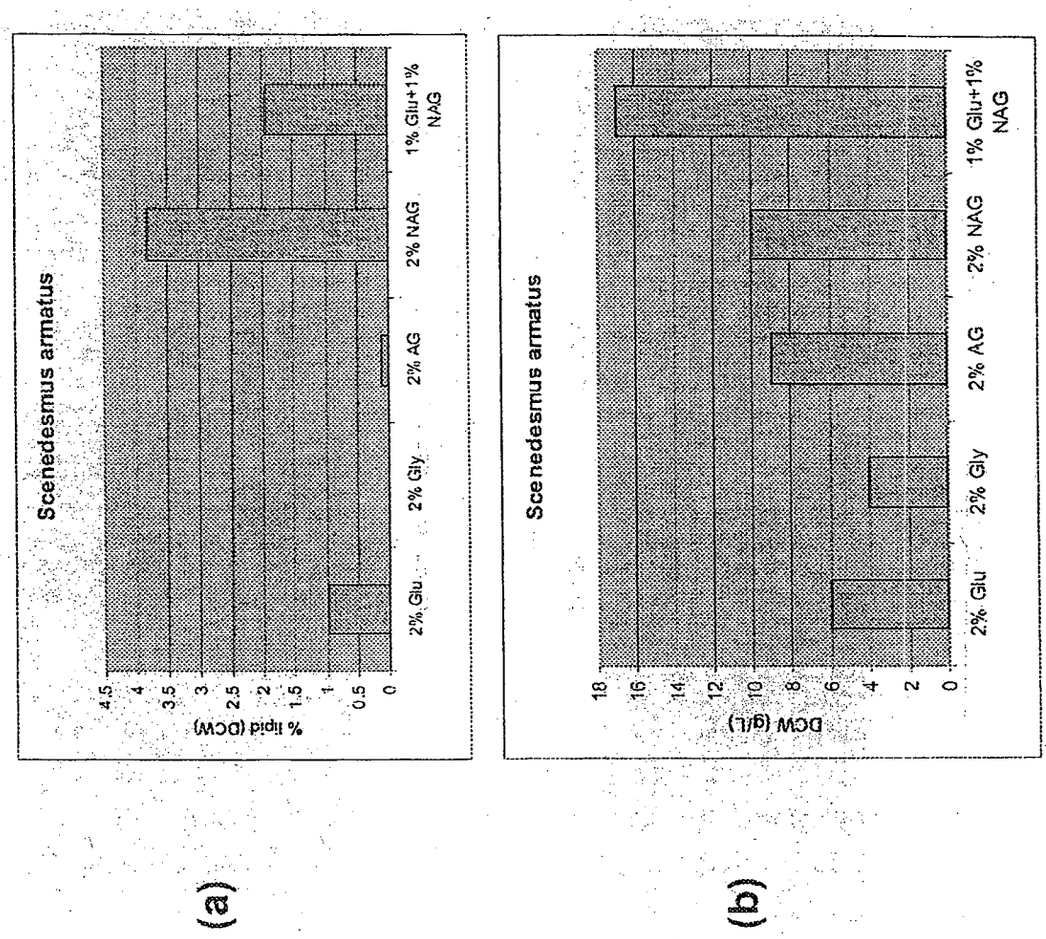

Scenedesmus armatus
% lipid (DCW)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
2% Glu
2% Gly
2% AG
2% NAG
1% Glu+1% NAG
(a)
Scenedesmus armatus
DCW (g/L)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
2% Glu
2% Gly
2% AG
2% NAG
1% Glu+1% NAG
(b)

Figure 12

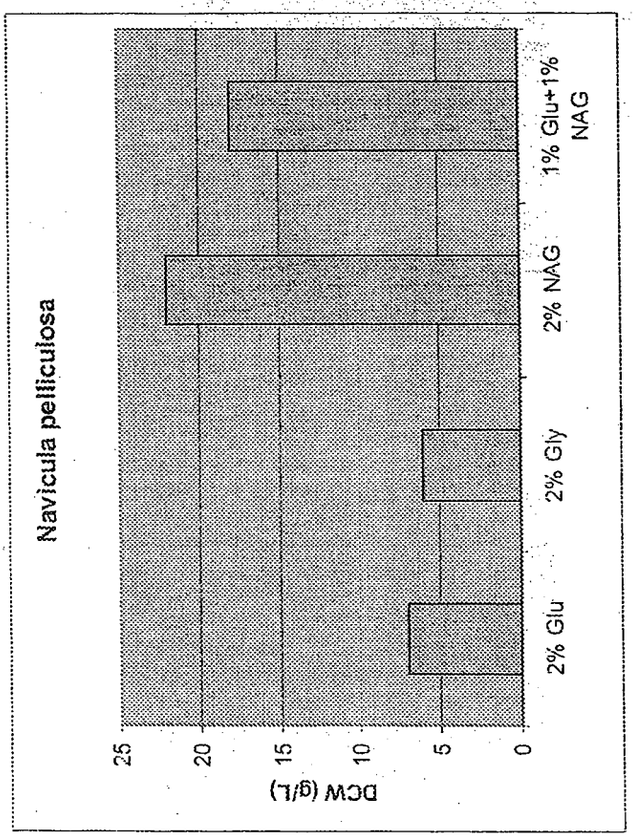
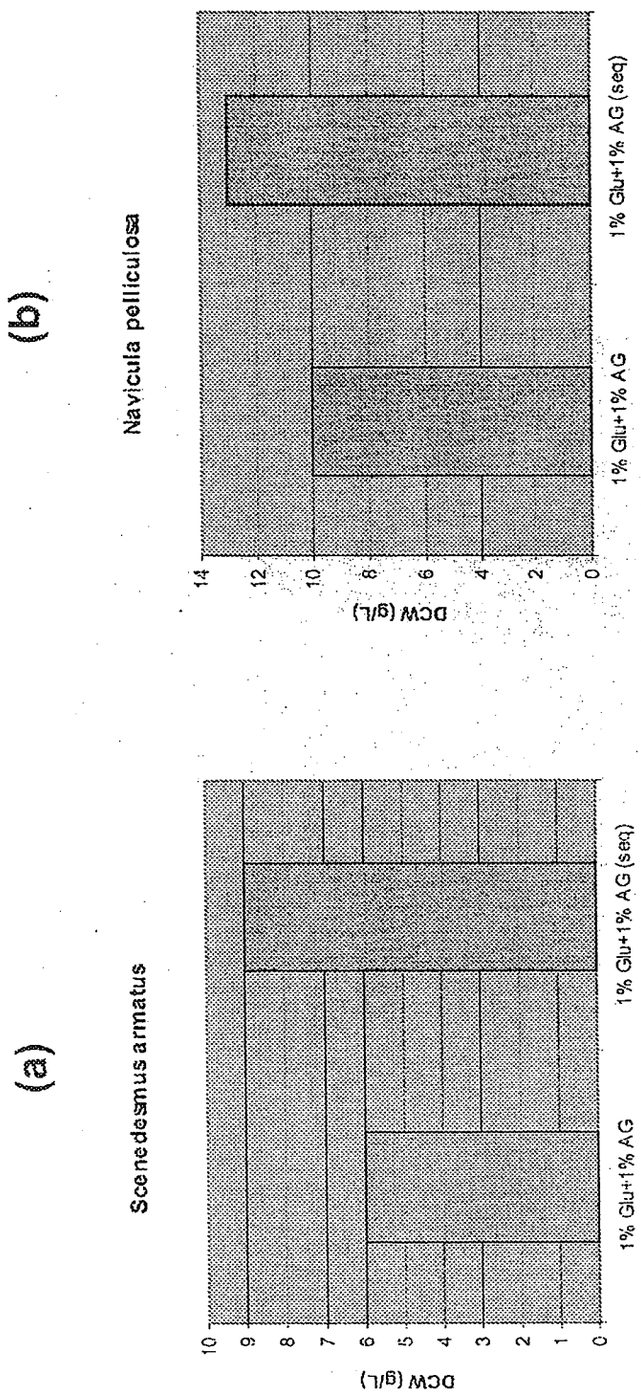

Navicula pelliculosa
DCW (g/L)
0
5
10
15
20
25
2% Glu
2% Gly
2% NAG
1% Glu+1% NAG

Figure 13

Figure 14


(a)
Scenedesmus armatus
DCW (g/L)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1% Glu+1% AG
1% Glu+1% AG (seq)
(b)
Navicula pelliculosa
DCW (g/L)
0
2
4
6
8
10
12
14
1% Glu+1% AG
1% Glu+1% AG (seq)

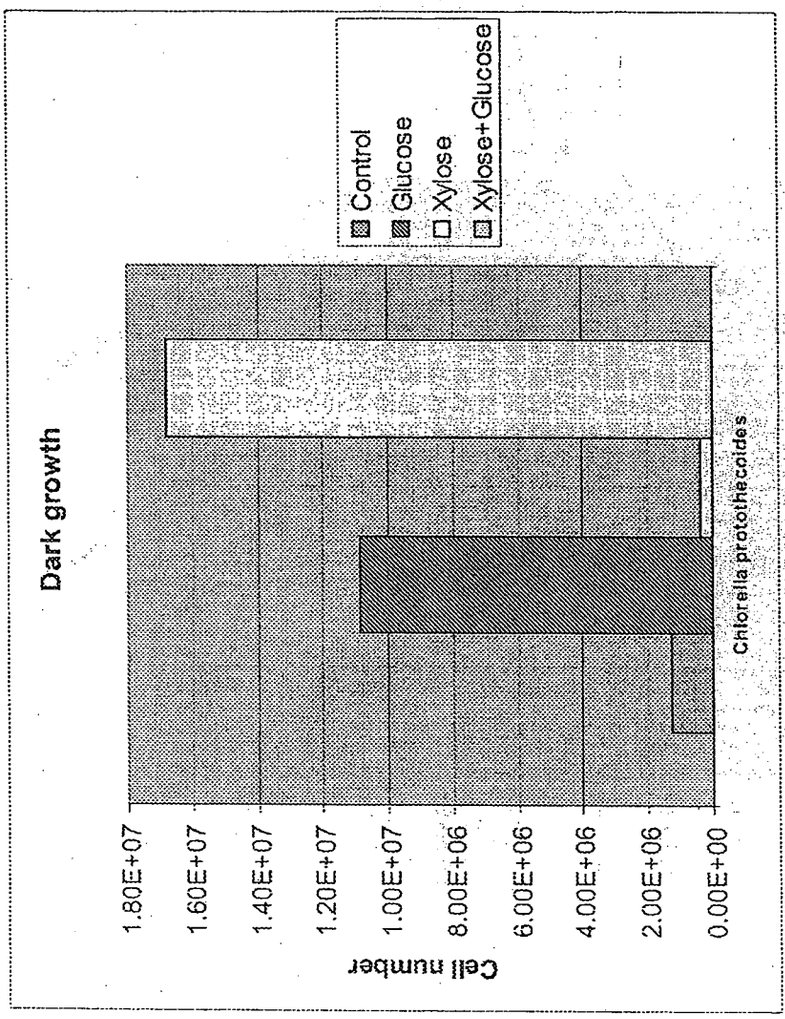

Dark growth
Control
Glucose
Xylose
Xylose+Glucose
Cell number
1.80E+07
1.60E+07
1.40E+07
1.20E+07
1.00E+07
8.00E+06
6.00E+06
4.00E+06
2.00E+06
0.00E+00
Chlorella protothecoides

Figure 15

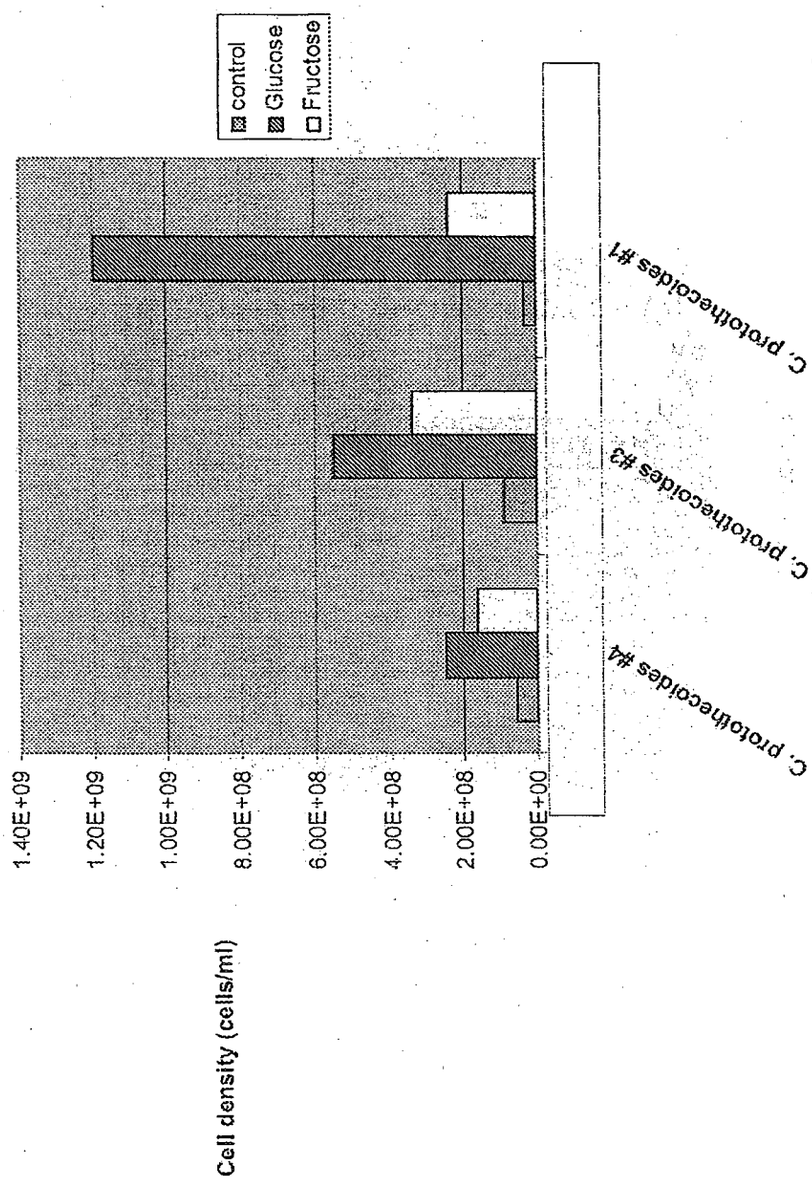

control
Glucose
Fructose
C. protolitecoides #1
C. protolitecoides #3
C. protolitecoides #4
1.40E+09
1.20E+09
1.00E+09
8.00E+08
6.00E+08
4.00E+08
2.00E+08
0.00E+00
Cell density (cells/ml)

Figure 16

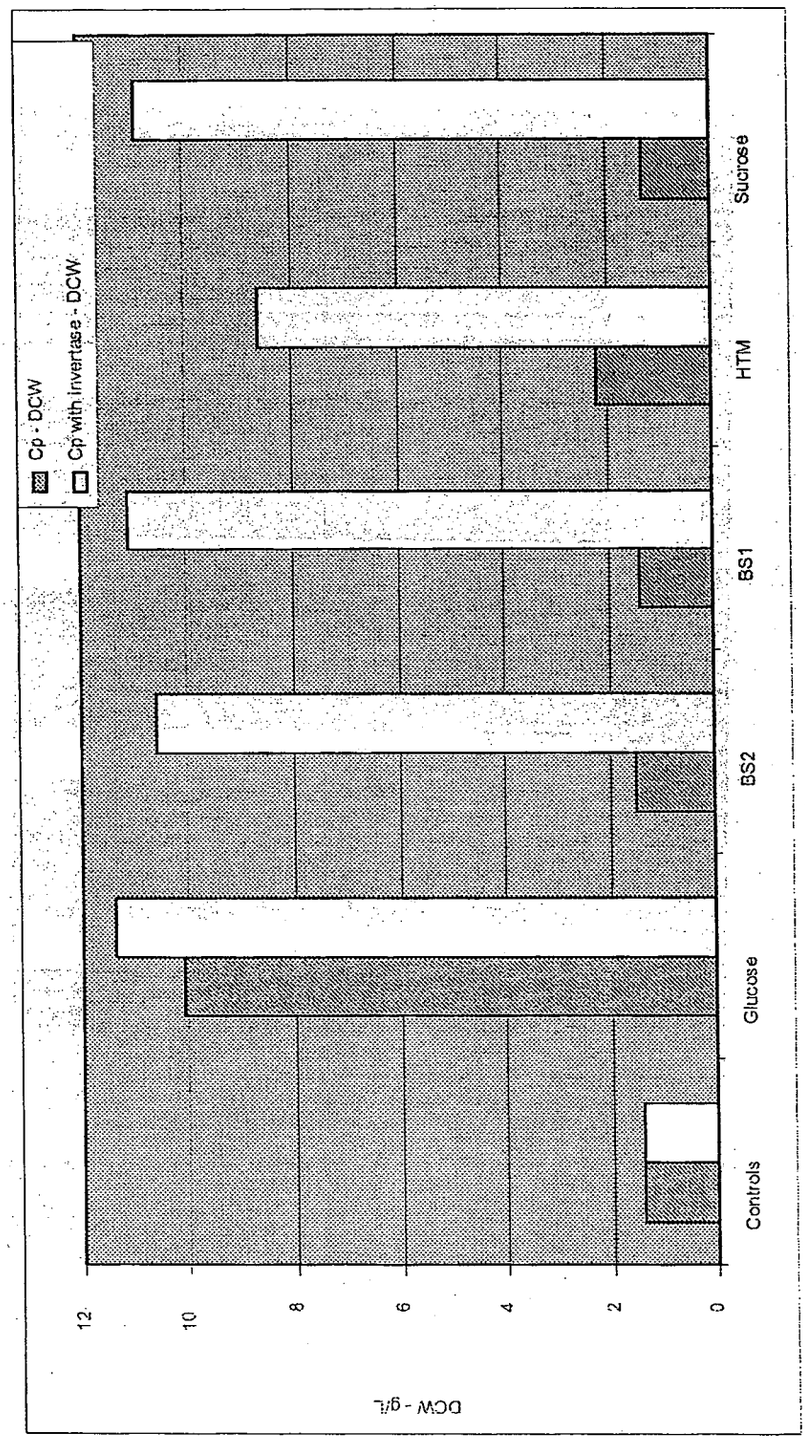

Cp - DCW
Cp with invertase - DCW
DCW - g/L
0
2
4
6
8
10
12
Controls
Glucose
BS2
BS1
HTM
Sucrose
Feedstock (Molasses/Sugar)

Figure 17

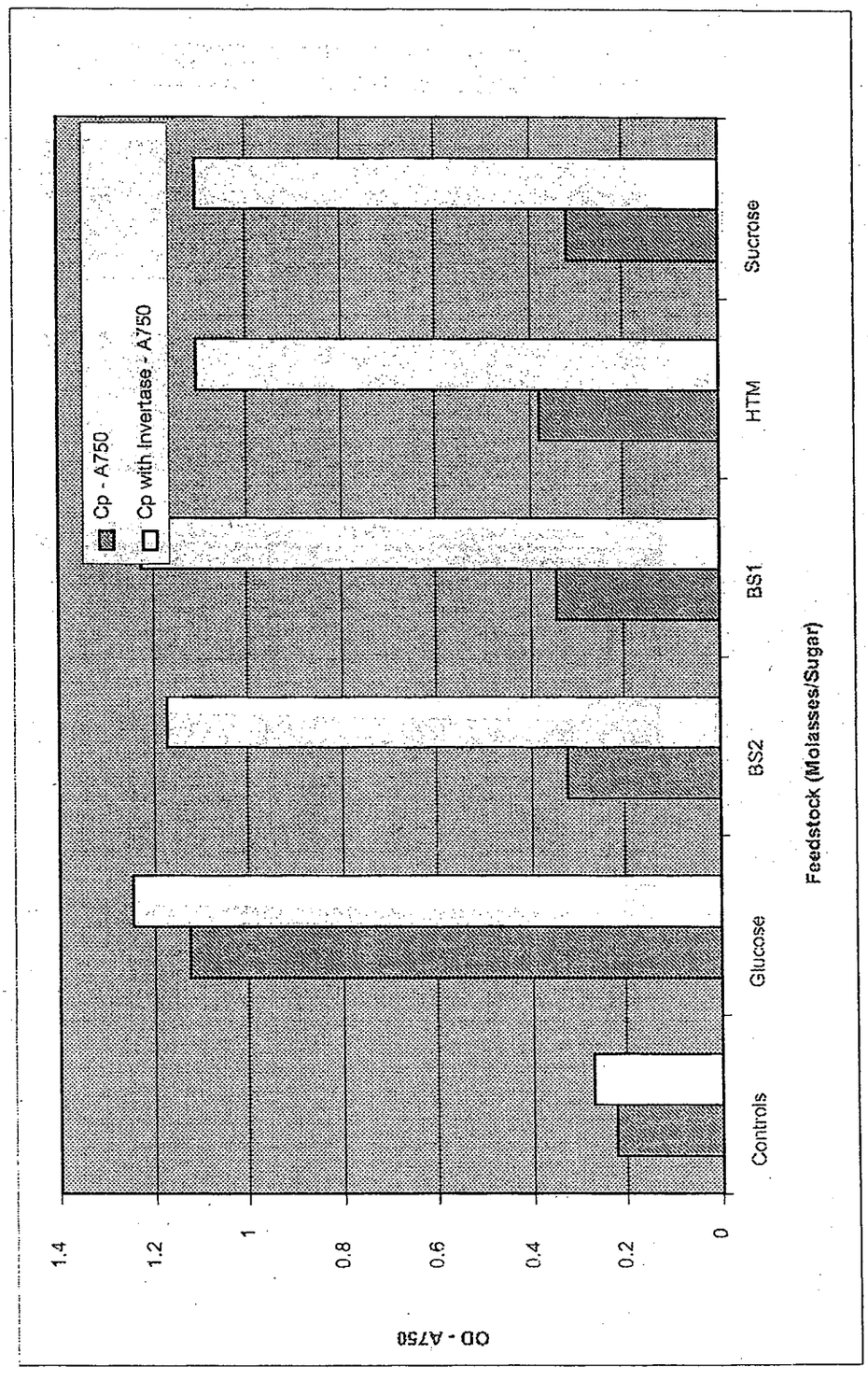

OD - A750
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Controls
Glucose
BS2
BS1
HTM
Sucrose
Feedstock (Molasses/Sugar)
Cp - A750
Cp with invertase - A750

Figure 18

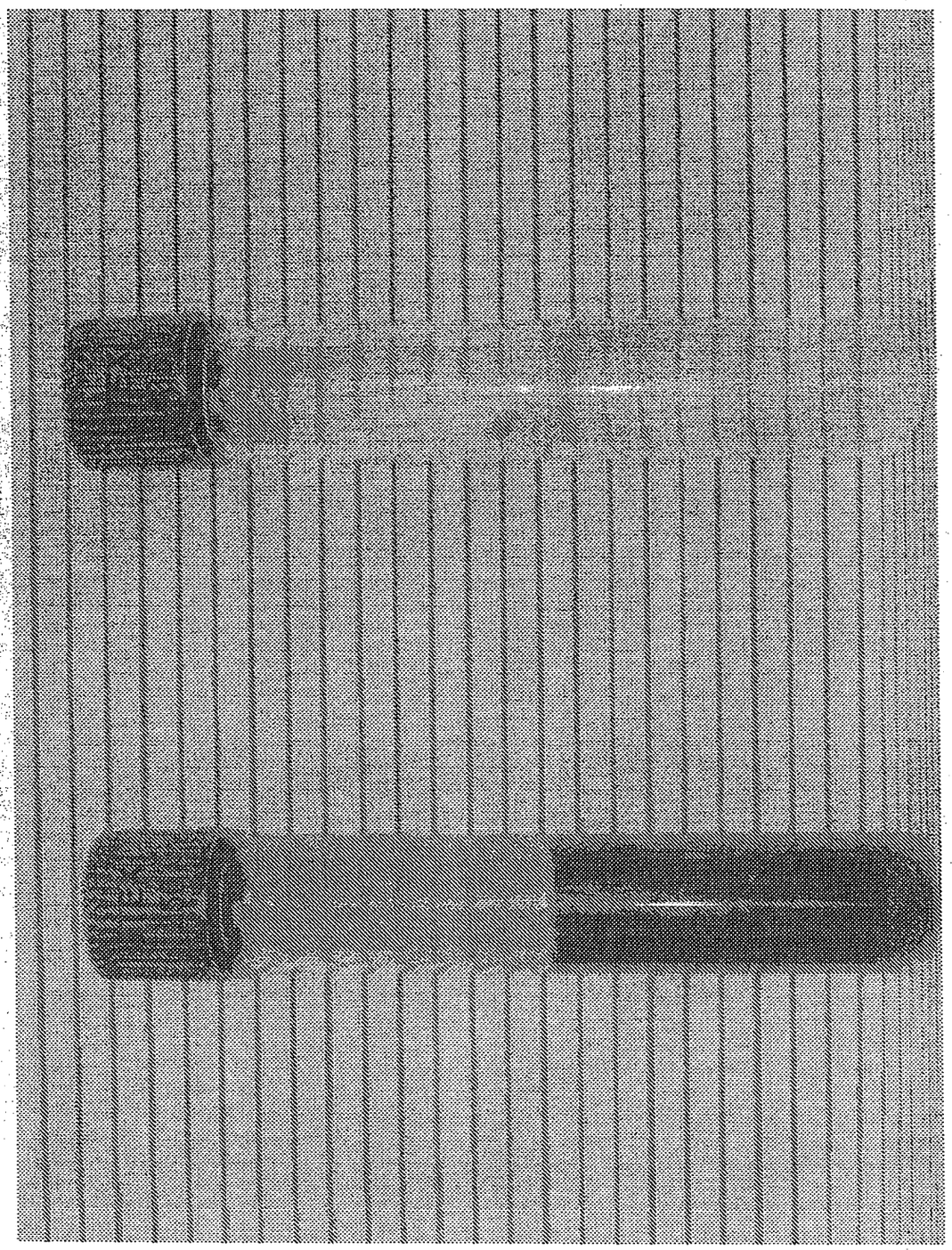


Figure 19

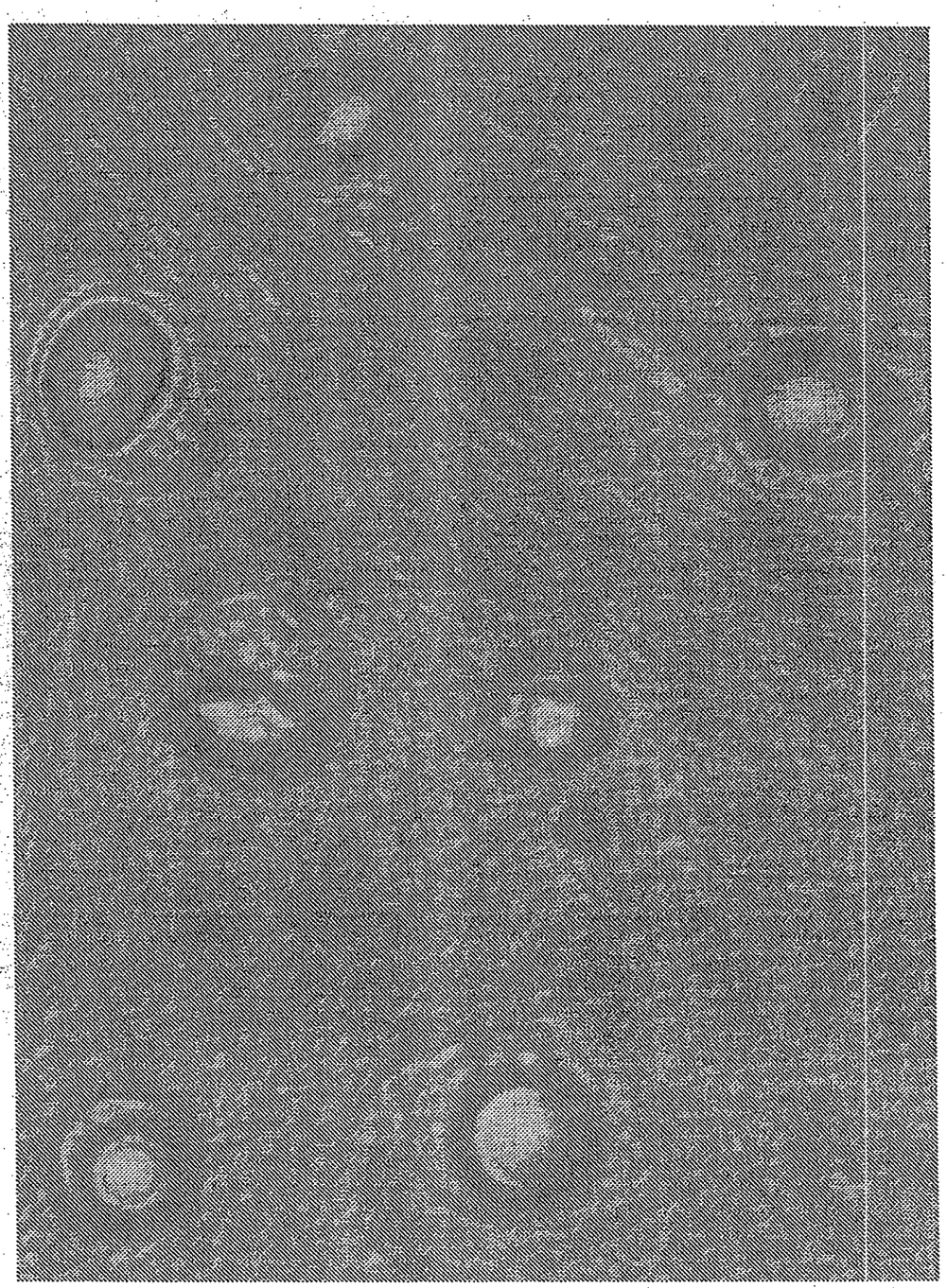


Figure 20

Figure 21a

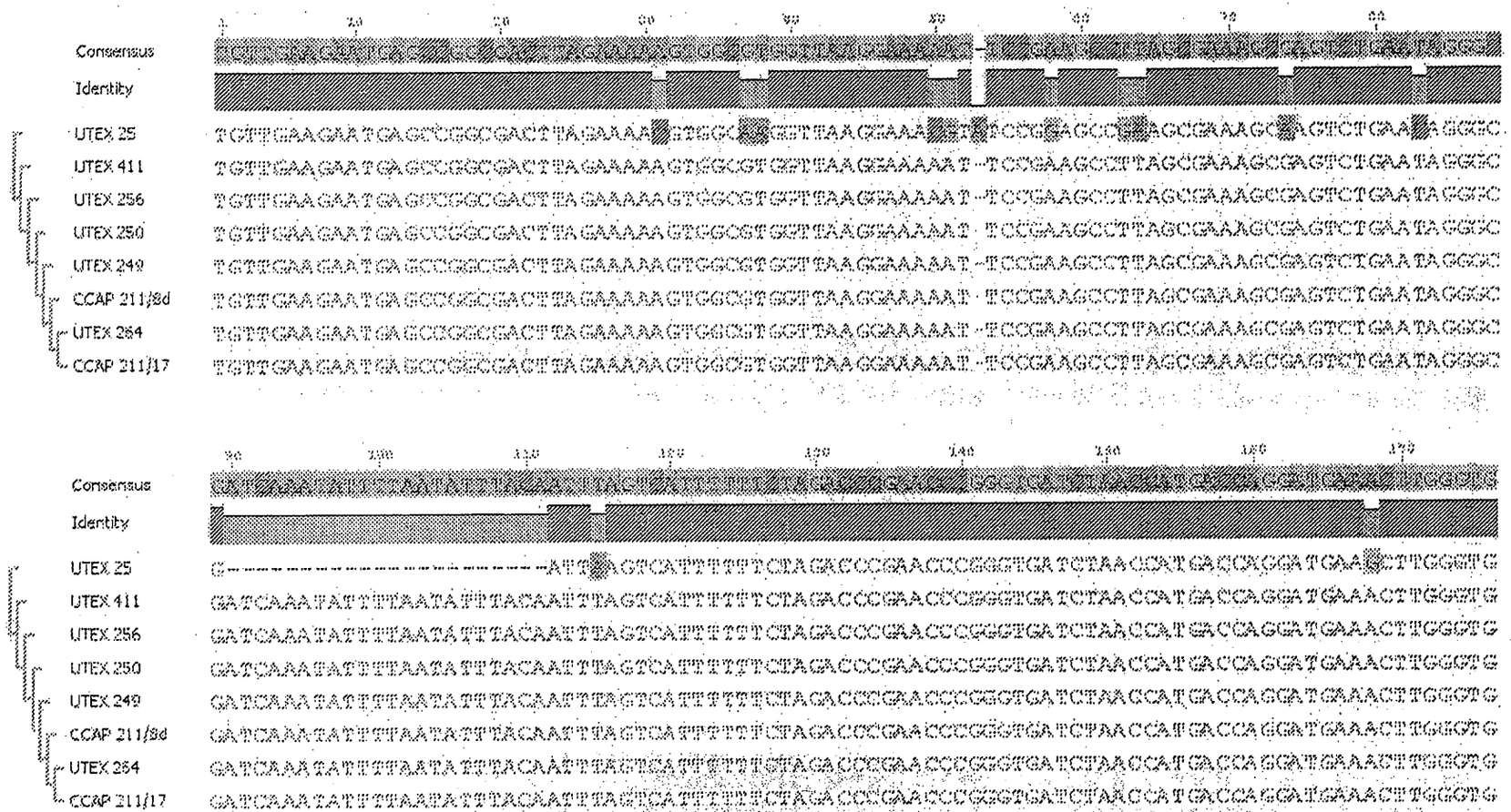

Consensus
Identity
UTEX 25
UTEX 411
UTEX 256
UTEX 250
UTEX 249
CCAP 211/8d
UTEX 264
CCAP 211/17

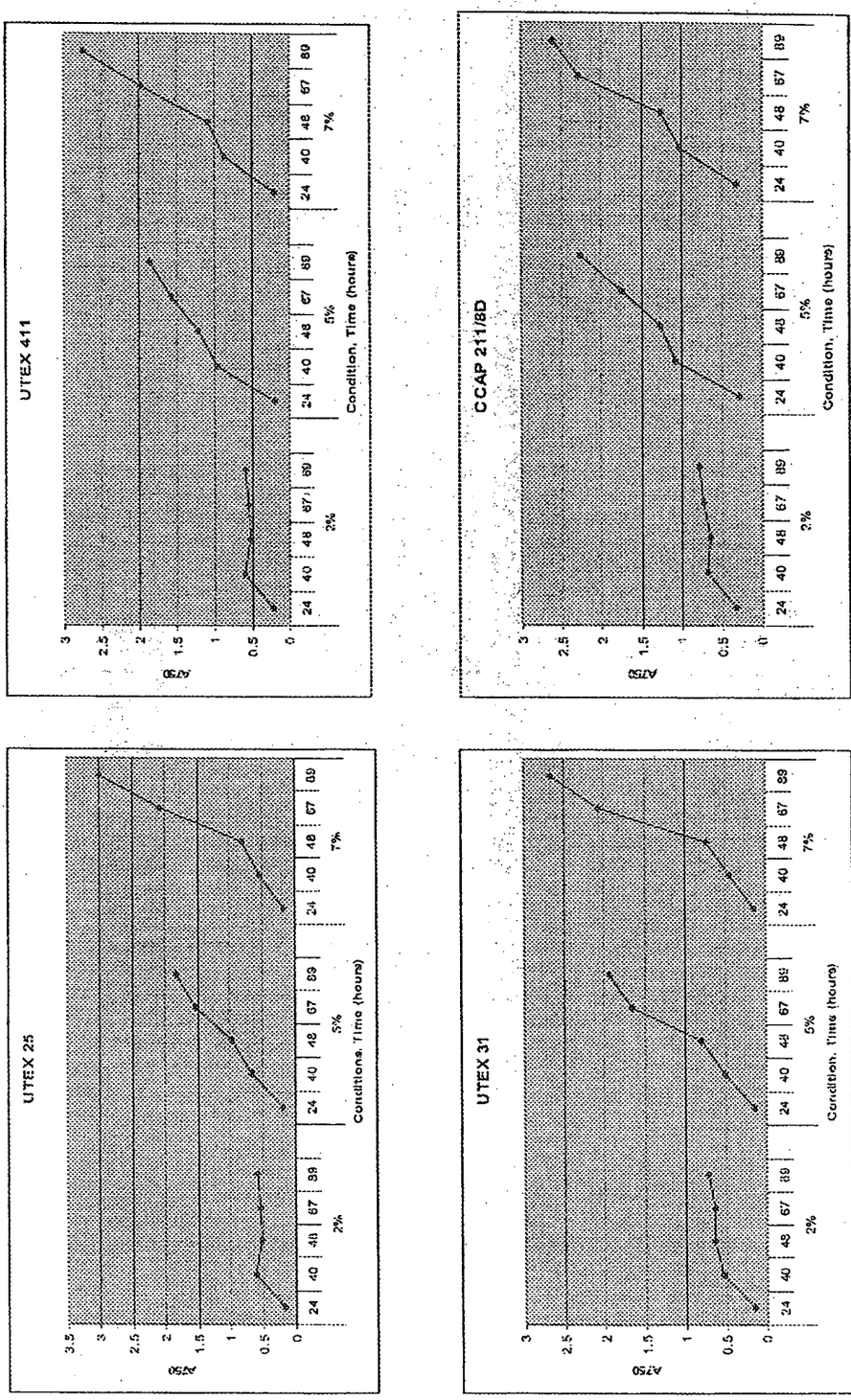
Figure 21b

Consensus
Identity
UTEX 25
UTEX 411
UTEX 356
UTEX 250
UTEX 249
CCAP 211/8d
UTEX 264
CCAP 211/17

Consensus
Identity
UTEX 25
UTEX 411
UTEX 256
UTEX 250
UTEX 249
CCAP 211/8d
UTEX 264
CCAP 211/17

Figure 21c

Figure 22


UTEX 411
UTEX 25
CCAP 211/8D
UTEX 31
A750
Condition, Time (hours)
Conditions, Time (hours)
2%
5%
7%

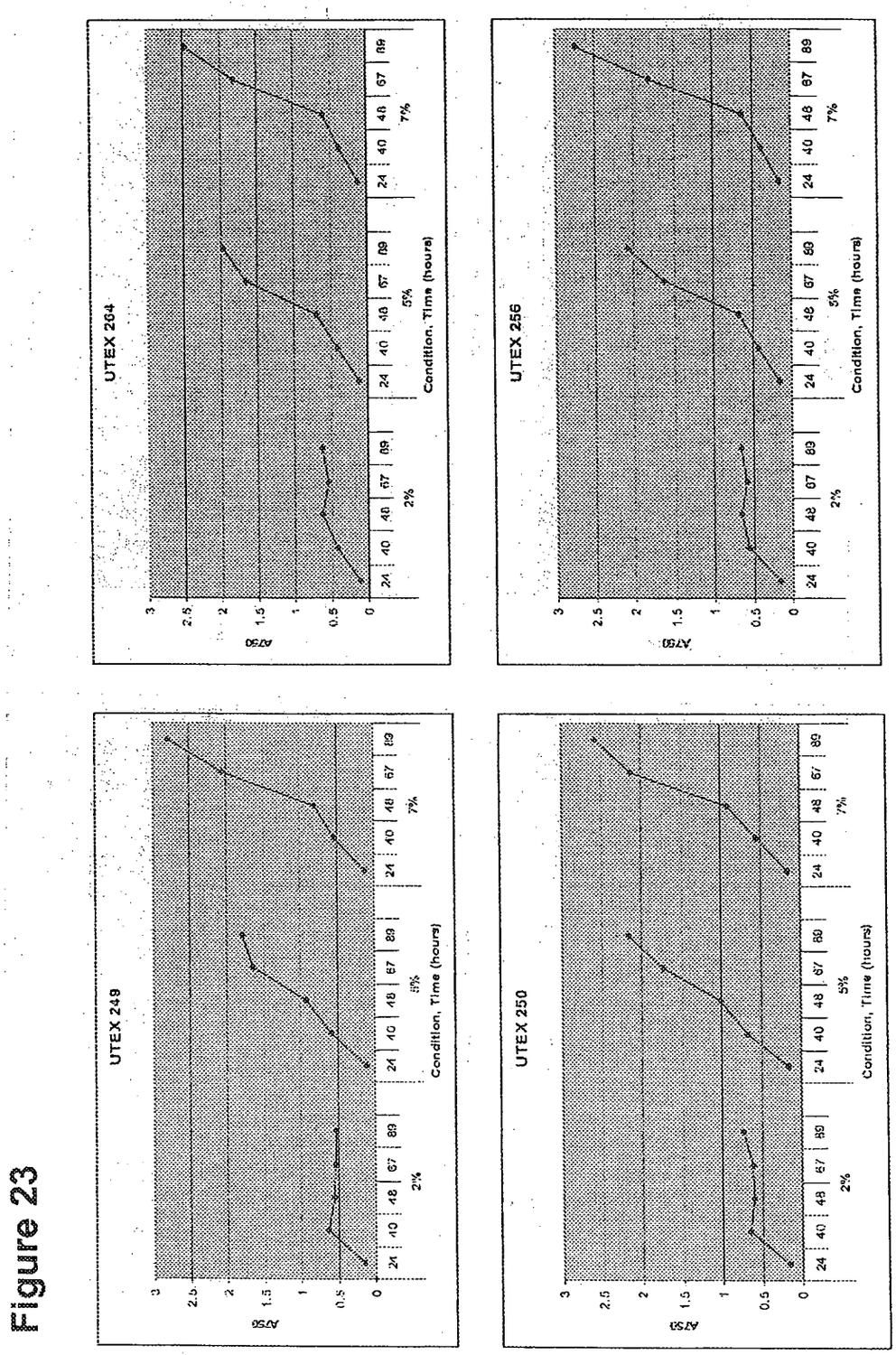
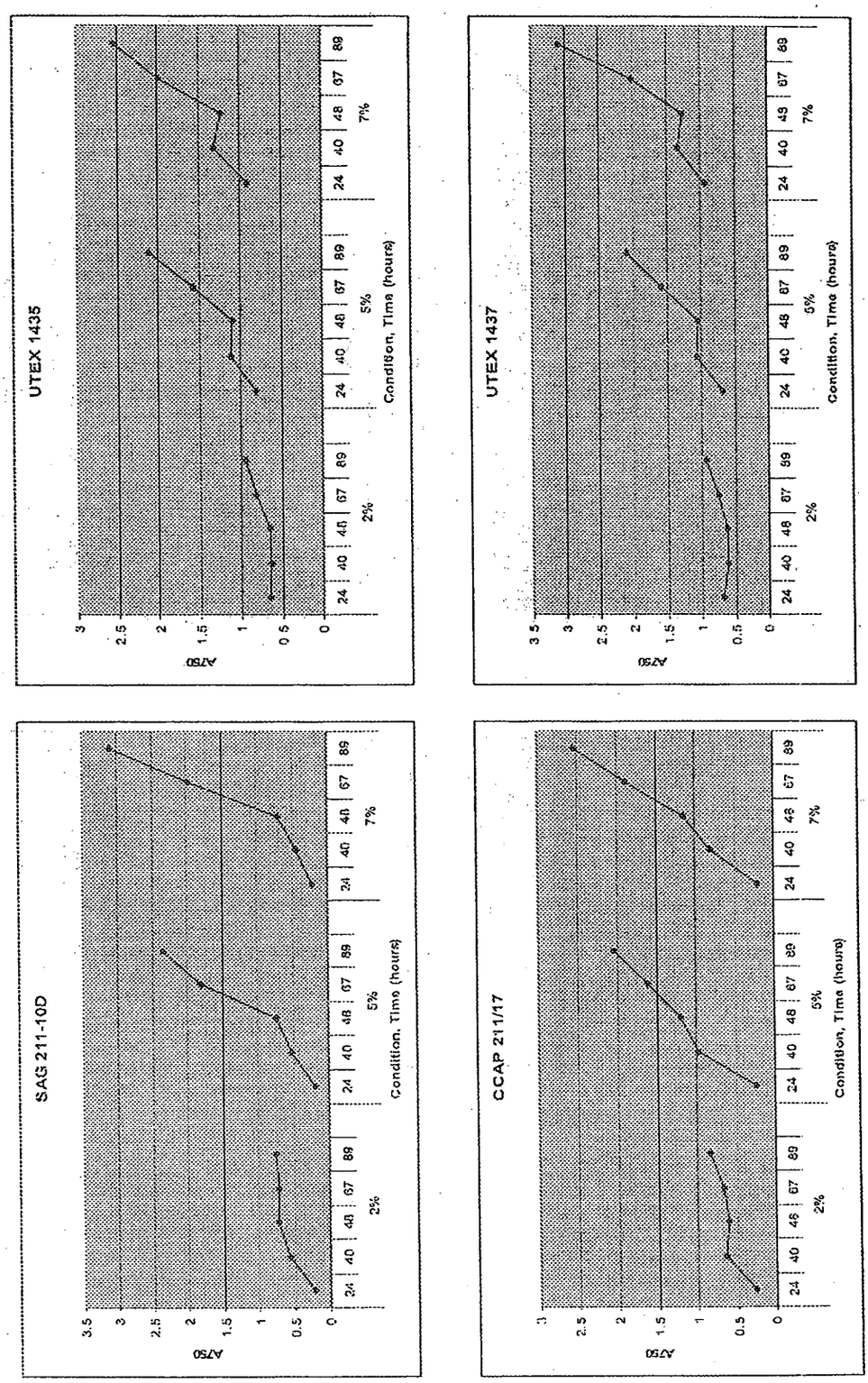

UTEX 264
UTEX 256
UTEX 248
UTEX 250
A750
Condition, Time (hours)
2%
5%
7%

Figure 23

Figure 24


UTEX 1435
UTEX 1437
SAG 211-10D
CCAP 211/17
A750
Condition, Time (hours)
2%
5%
7%

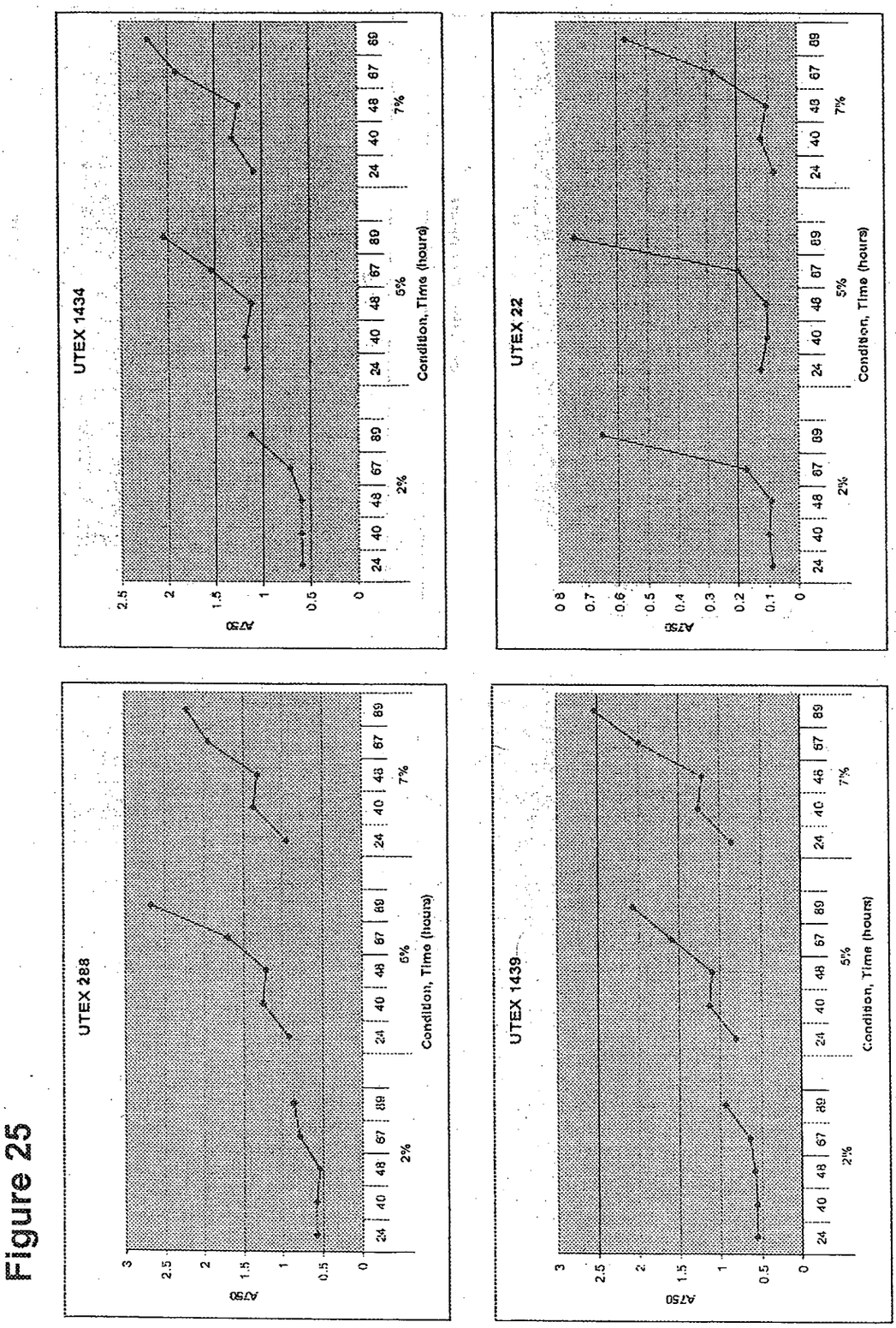

UTEX 1434
UTEX 22
UTEX 288
UTEX 1439
A750
Condition, Time (hours)
2%
5%
7%

Figure 25

Figure 26

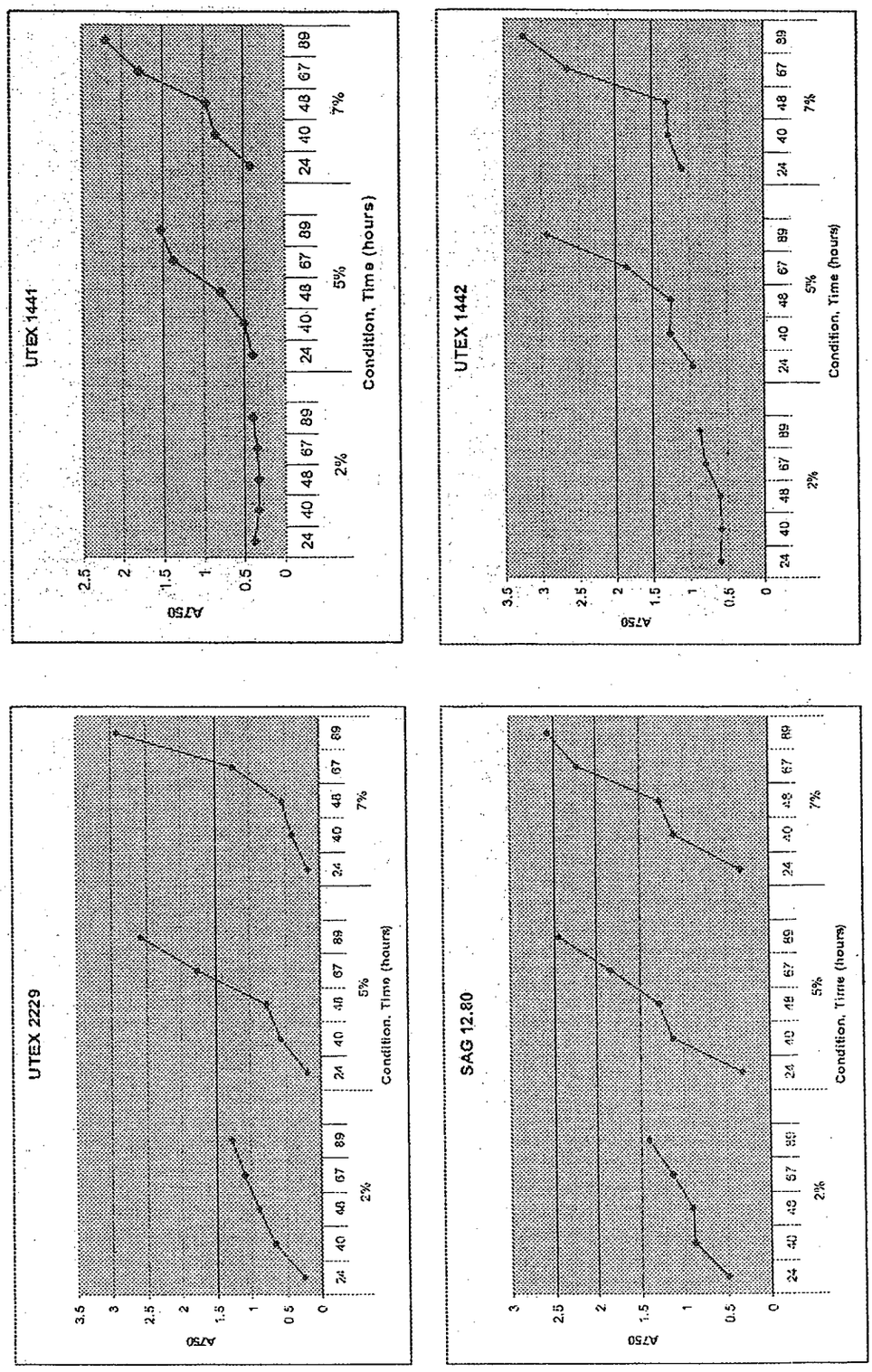

UTEX 1441
UTEX 1442
UTEX 2229
SAG 12.80
A750
Condition, Time (hours)
2%
5%
7%

Figure 27

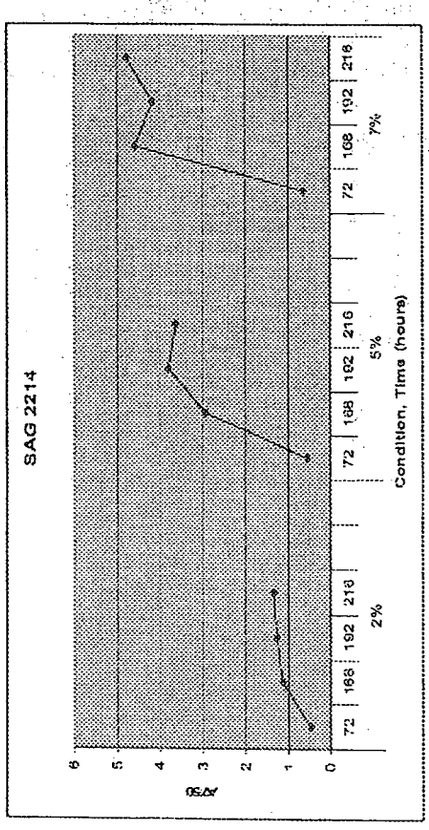


Figure 28

Diversity of Lipid Chains in Microalgal Species									
Strain # From Table 8	C:14:0	C:16:0	C:16:1	C:18:0	C:18:1	C:18:2	C:18:3	C:20:0	C:20:1
1	0.57	10.30	0	3.77	70.52	14.24	1.45	0.27	0
2	0.61	8.70	0.30	2.42	71.98	14.21	1.15	0.20	0.24
4	0.68	9.82	0	2.83	65.78	12.94	1.46	0	0
5	1.47	21.96	0	4.35	22.64	9.58	5.2	3.88	3.3
10	0	12.01	0	0	50.33	17.14	0	0	0
11	1.41	29.44	0.70	3.05	57.72	12.37	0.97	0.33	0
12	1.09	25.77	0	2.75	54.01	11.90	2.44	0	0

Figure 29a

Consensus
Identity
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figure 29b

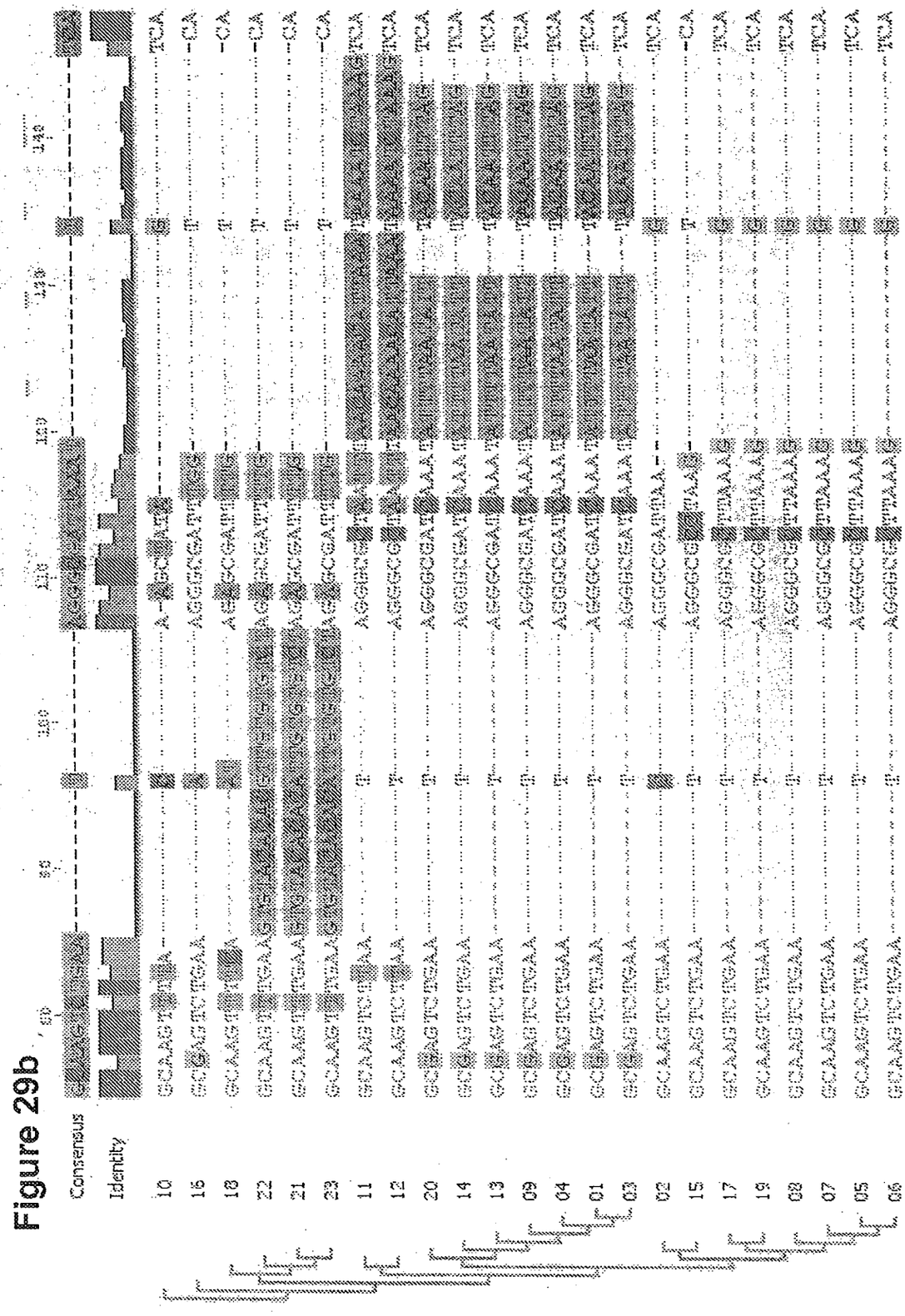

Consensus
Identity
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figure 29c

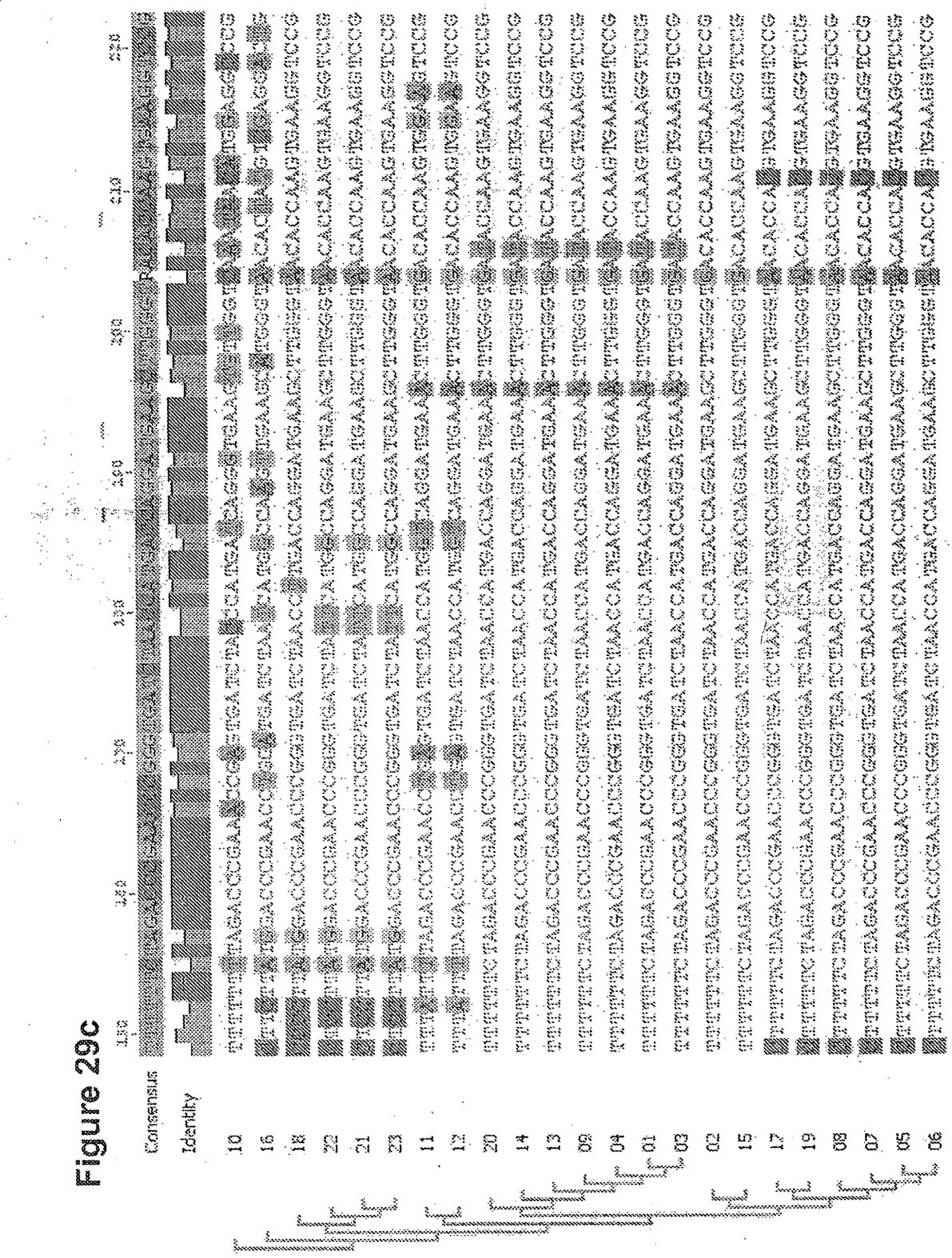

Consensus
Identity
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figure 29d

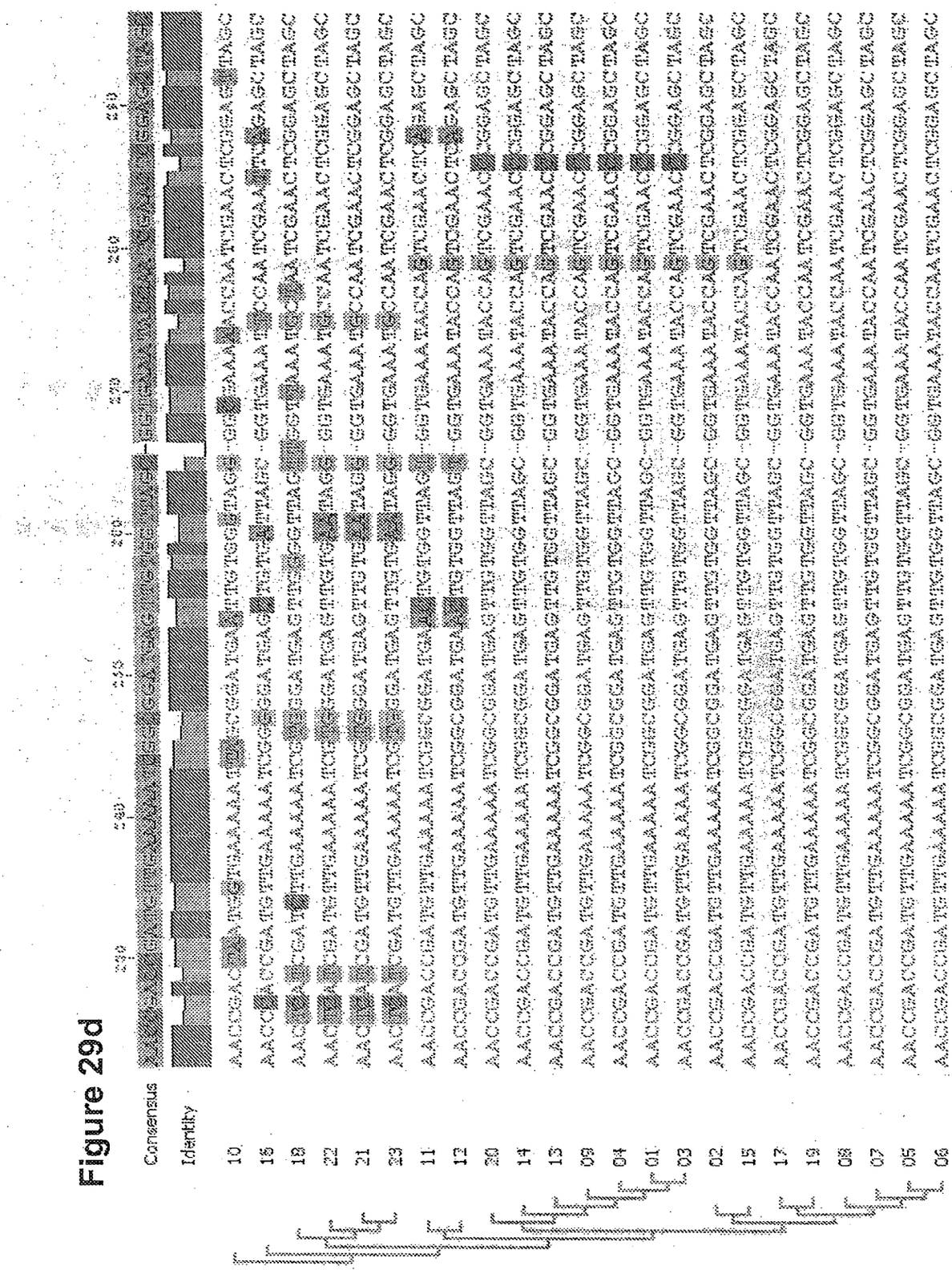

Consensus
Identity
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figure 29g

Consensus
Identity
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figure 29h

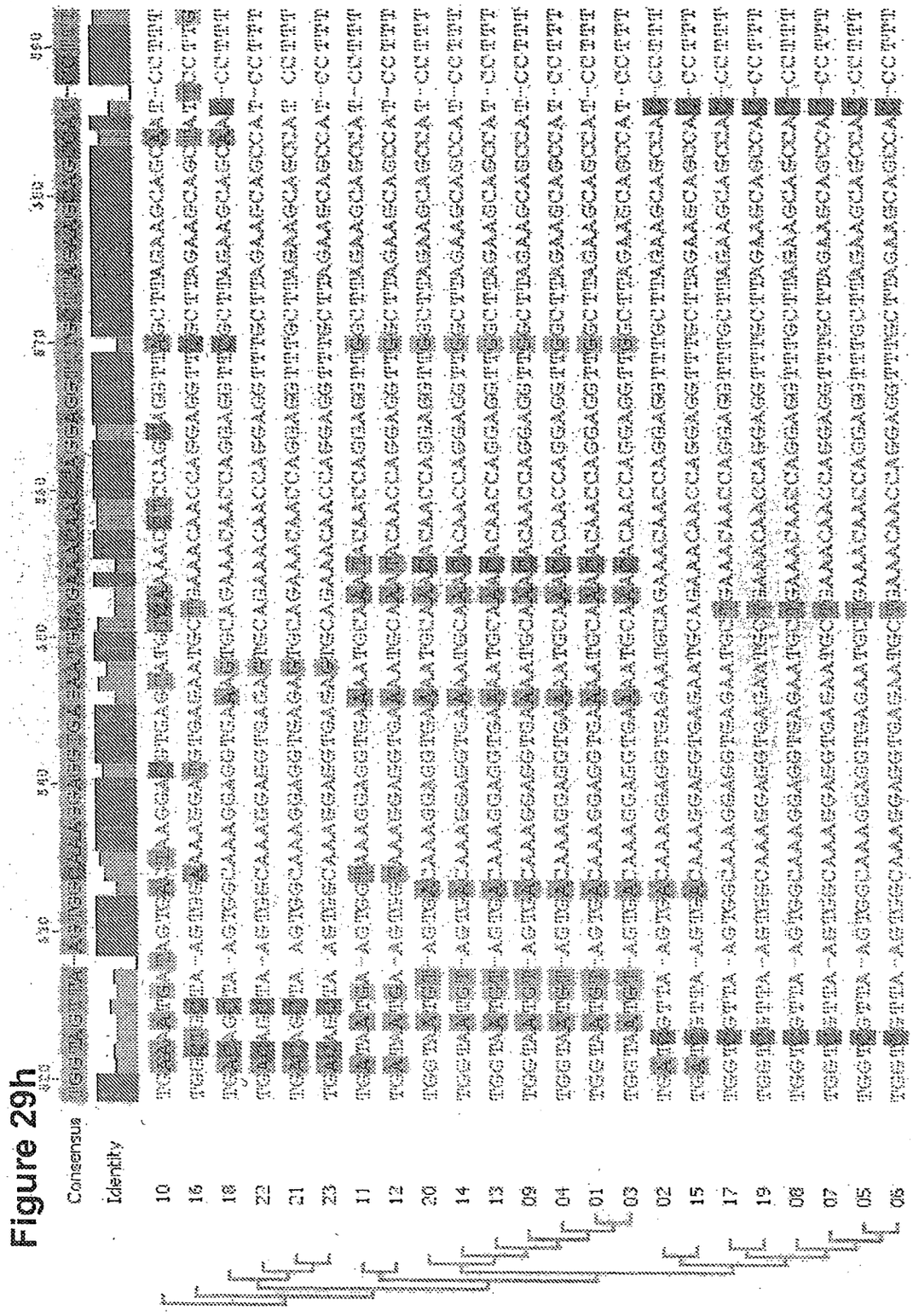

Consensus
Identity
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figure 29i

Consensus
Identity
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

MODIFICACIÓN QUÍMICA DIRECTA DE BIOMASA MICROBIANA Y ACEITES MICROBIANOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

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)).

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 (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 refinadas más baratas tales como grases de restaurante agotada y pasta de neutralización procedente de refinado alcalino o parafina amorfa de soya (véase, por ejemplo Mittelbach, M , and P Tnttthart, J Am Oil Chem Soc , 65(7) 1185-1187 (1988), Graboski, M S , et al , The Effect of Biodiesel Composition on 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.

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 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 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 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 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 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.

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 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 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 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 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 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 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.

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 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 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 autolisis 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 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 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 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.

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 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 eucariónticas, levadura oleaginosa y hongos. En algunas modalidades, los microbios son seleccionados del grupo que consiste de microalgas eucariónticas enlistadas en la Tabla 1. En algunas modalidades, los microbios son una especie del género *Chlorella* y en varas 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 alcalinmo 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 lípido. 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 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, aceites de sabor, botánicos, extractos, extractos de CO_2, 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, 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. 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, 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 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 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 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, 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% 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.

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 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 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 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 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 cadena más cortas.

En orto 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 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 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 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 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 colsa,

canola, palma, de semilla de balma, coco, maíz, vegetal de desperdicio, cebo chino, oliva, girasol, semilla de algodón, 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, 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 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, 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 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.

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.

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

La Figura 12(a) muestra el lípido como por ciento de 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 *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 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 donde el glicerol es agregado secuencialmente o en combinación con glucosa.

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

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, 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 melasas (designadas BS1, BS2 y HTM) en presencia o ausencia de una sacarosa invertasa 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 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 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.

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.

"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 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 acido graso como un tiol ester en el tiol distante 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 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 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.

"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 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 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 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 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.

"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-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 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.

"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 mARN, que puede ser obtenido, por ejemplo mediante 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 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. 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 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 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 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 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 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 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 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 incremento en la productividad del lípido de un cultivo microbiano, que puede ser obtenido por ejemplo al incrementar el peso seca de las células por litro de cultivo, incrementar el porcentaje de células que constituyen el lípido o incrementar la cantidad global de lípido por litro de volumen de cultivo por tiempo unitario.

"Promotor inducible" es un promotor que modera la

transcripción de un gen enlazado operativamente en respuesta a un estímulo particular.

"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.

"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 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 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 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 (esfingolipidos, esterol lípidos o lípidos de esterol que incluyen colesterol y hormonas esteroides, 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; esteres de ácidos grasos; esteroles; pigmentos (por ejemplo carotenoides y oxicarotenoides), xantófilos, fitoesteroles, ergotionina, ácido lipoico, antioxidantes en los que se incluyen beta-caroteno y tocoferol. También incluidos están los ácidos grasos poli insaturados 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 docosahexaenoico (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% 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 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 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 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 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 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 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 geológicamente, aceite vegetal, aceite de algas y lípidos microbianos.

"Levadura oleaginosa" como se usa en la presente, significa levadura que puede acumular más de 10% de DCW como lípido. La levadura oleaginosa incluye levaduras tales como 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 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 eflusión 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 presnta 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.

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 valisos 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 esteres de ácido graso (FAME)) al cultivar una población de 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 transesterifación es luego llevada a cabo por la 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.

La transesterifación directa de la biomasa, sin una etapa de proceso de separación intermedia en la cual los componentes lipofílicos son extraidos de la biomasa antes de la transesterificación, permite la producción de biodiesel a costos extensamente reducidos, en comparación con métodos que 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 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 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 esteres de ácido graso generados de células que comprenden 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 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 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 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 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.

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 lípido 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 lípido, 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.

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 desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri,

Chlorella lobophora (strain SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (including any of UTEX strains 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei,

Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta, Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEX LB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp., Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, 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.

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 en la Tabla 3.

Tabla 3. Ejemplos de hongos.

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

Consideraciones que afectan la selección de un 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 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 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 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 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 a!., Bot Bull Acad Sm (2001) 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 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 (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 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 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%, 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 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 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 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, 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 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. 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 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 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 escala grande.

1. MÉTODOS DE CULTIVO FOTOSINTÉTICOS

Los microorganismos fotosintéticos, tales como microalgas, pueden ser cultivados en presencia de luz y un 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 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/CO_2, 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/Co_2 pueden ser moduladas para generar cantidades óptimas de Co_2 para el crecimiento máximo por un organismo particular. Las microalgas crecen significativamente más rápido en la luz bajo por ejemplo, 3% de CO_2/97% de aire que en 100% de aire. El 3% de CO_2/97% de aire tiene aproximadamente 100 veces más de Co_2 que aire. Por ejemplo, las mezclas de aire:CO_2 de aproximadamente 99.75% de aire:0.25% de CO_2, aproximadamente 99.5% de aire:0.5% de CO_2, aproximadamente 99.0% de aire: 1.00% de CO_2, aproximadamente 98.0% de aire:2.0% de CO_2,

aproximadamente 97.0% de aire:3.0% de CO_2, aproximadamente 96.0% de aire:4.0% de CO_2, y aproximadamente 95.00% de aire:5.0% de CO_2, puede ser infusionado a un bioreactor o fotobioreactor de acuerdo con los métodos presentes. Una mezcla de 5% de CO_2:95% 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 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®, 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 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 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.

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 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.

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 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, $CoCl_2$ $6H_2O$, $CuCl_2$ $2H_2O$, $MnCl_2$ $4H_2O$ and $(NH_4)_5Mo_7O_{24}$ $4H_2O$. Estos y otros 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.

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 concentración de por lo menos aproximadamente 50 µM, por lo menos aproximadamente 100 µM, por lo menos aproximadamente 500 µM, por lo menos aproximadamente 5 mM, por lo menos aproximadamente 50 mM y por lo menos aproximadamente 500 mM de una o más fuente(s) de carbono fija(s) provista(s) 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 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 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 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, amoniaco (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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 & Bioengineenng 102(1):100-112 (2008)) . Solovchenco 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 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 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 cultivos de Dumaliella tertiolecta cultivados en condiciones de NaCl incrementadas (Takagi et al , Journal ofBiosaence and Bioengineennng 101(3) 223-226 (2006)) y 75% de acumulación de lípido en cultivos de Botrycoccus braunii (Banerjee et al , Critical Reviews in Biotechnology 22(3) 245-279 (2002)). Estos 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 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 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 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 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, 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 (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 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 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 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 luteovirdis, Prototheca monformis, Chlorella kesslen, Parachlorella kesslen y Prototheca stagnora pueden utilizar 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 heterogenia de compuestos, tales como desperdicio 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 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 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 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 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.

Parámetros de cultivo mejorados incorporan el uso de glicerol para fermentación de múltiples géneros tanto de microbios eucariónticos como procariónticos, en los que se

incluyen microbios de los géneros Chlorella, Navicula, Scenedesmus and Spiruhna, como se describe en la presente. Como 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 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.

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 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 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 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 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 producto secundario de glicerol de la transesterificación que en una cantidad equivalente de glicerol grado reactivo. El producto secundario de glicerol de la transesterificación contiene usualmente metanol residual y otros contaminantes además de glicerol. Por ejemplo, las Figuras 1-6 demuestran que las cepas de Chlorella protothecoides y Chlorella kessleri exhiben mejor productividad sobre 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 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 glicero 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 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 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 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 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 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 lípido 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 (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 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 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 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 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 sinergístico proporciona una ventaja significativa en que 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 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 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.

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 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 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 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 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 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 expresión de una sacarosa invertasa una señal de secreción genera actividad de invertasa al exterior de la célula. Véase Hawkins et al., Current Microbiology VoI 38 (1999), páginas

335-341, para ejemplos de señales de secreción activas en Chlorella. La expresión de tal proteína permite que las células 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, 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 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 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 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

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, 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 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 opcionalmente a cero, remover o eliminiar 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 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 descendentemente 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 también ser incrementada mediante regulación ascendente de la proteína portadora de acilo (ACP), que porta las cadenas de acilo crecientes durante la síntesis de acido graso (ejemplos, algunos de microalga, incluyen aquellos descritos bajo los números de acceso de Genbank AOT0F8; P51280; NP_849041; 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 Genbank AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857; y ABO94442). Las proteínas precedentes són candidatos para expresión en microalgas, en las que se incluyen especies del género Chlorella.

La regulación descendente de una enzima de interés puede ser obtenida utilizando, por ejemplo ARN/ADN 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 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.

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 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 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 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 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 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 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 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 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 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.

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 tioestarasas grasas y números de acceso de Genbank.

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

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

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

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

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)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Populus tomentosa (GenBank #ABC47311)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Arabidopsis thahana (GenBank

#NP_172327)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Arabidopsis thahana (GenBank #CAA85387)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Arabidopsis thahana (GenBank #CAA85388)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Gossypmm hirsutum (GenBank #Q9SQI3)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea lanceolata (GenBank #CAA54060)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea hookenana (GenBank #AAC72882)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea calophylla subsp (GenBank #ABB71581)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea lanceolata thioesterase (GenBank #CAC19933)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Elaeis guineensis (GenBank #AAL15645)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Cuphea hookenana (GenBank #Q39513)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Gossypmm hirsutum (GenBank #AAD01982)

Acil-ACP tioesterasa grasa de Vitis vinifera (GenBank #CAN81819)

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

Acil-ACP tioesterasa grasa de Brassica juncea (GenBank #ABI 18986)

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)

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)

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 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.

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 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 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 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 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 VoI 35 (1997), pp 356-362, Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2000 JuI, 16(4) 443-6, Current Microbiology VoI 38 (1999), pp 335-341 , Appl Microbiol Bwtechnol (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 Plantanum 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 lipopylica) 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 alpine, Mucor circinelloid.es, 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-producmg 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 Spnng Harbor Press.

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 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.

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 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 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.

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 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 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 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 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 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 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 esteres 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 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. 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% 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 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 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.

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 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 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 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 proteináceos de los microorganismos usados. Bases que son útiles para solubilizar proteínas son conocidas en el arte de 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 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 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 biomasa portadora de aceite son alcalasa y mannaway (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 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 intregridad celular en base a la 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 las 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 eucariónticas 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.

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 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 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.

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. 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.

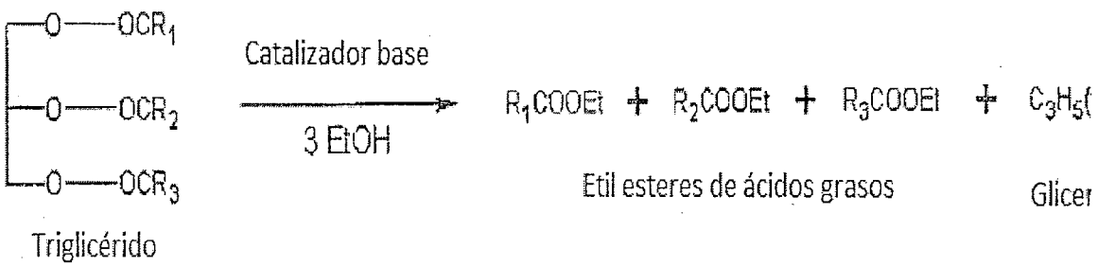
C. Transesterificación

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

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:



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 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-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

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 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 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

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 miehei (Lipozyme IM 20), lipasa de Pseudomonas fluorescein AAA25882, lipasa de Rhizopus japomcas (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 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 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 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.), 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 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 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 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 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 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 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 enlaxados 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 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 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.kasuza.or.jp/codon.

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 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 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*, 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 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. (3ª edición, 2001, Cold Spring Harbor Press y patente estadounidense No. 4,683,202). 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 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 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 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 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 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 celulares hasta el inicio de la reacción de transesterificación.

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

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 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 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 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 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 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 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 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 zeaxantia 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 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 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 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 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 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-caronteno no es mayor de 10 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β-caronteno no es mayor de 4 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β-caronteno no es mayor de 1.5 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β-caronteno no es mayor de 0.1 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β-caronteno no es menor de 0.1 microgramos por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la cantidad de β-caronteno no es menor de 1 microgramo por gramo de fase lipofílica. En algunas modalidades, la fase lipofílica contiene una cantidad de β-caronteno 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 modalidades, la cantidad de β-caronteno 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 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, 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 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 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 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. <u>Hidrogenación: Saturación de dobles enlaces</u>

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 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 hidrógeno.

La hidrogenación de biomasa producida por lo 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 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 (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 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**

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 proceso de interesterificación provee un mecanismo mediante el cual los constituyentes de ácido graso de una mezcla de glicerolípidos puede ser rearreglado para modificar el patrón de distribución. La interesterificación es un proceso químico bien conocido y comprende en general el calentamiento de una 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 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 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 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 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 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 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 cacahuate); 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 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 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 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, incorporada en la presente por referencia.

C. <u>Hidroxilación: Saturación vía la adición de agua a dobles enlaces</u>

La hidroxilación involucra la adición de agua a un 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., *JAOCS* 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 (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 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 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, 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 and Medicine, 37: 1, 104-114 (2004), cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia.

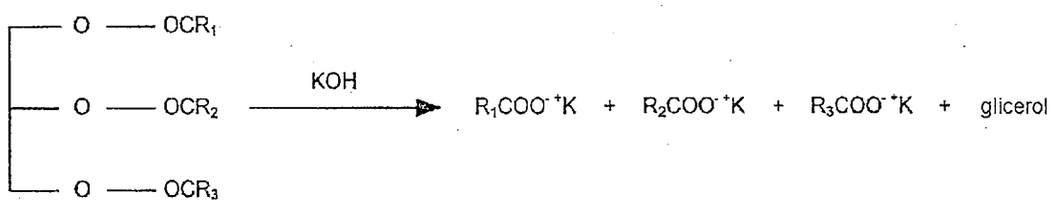
En algunos métodos, la primera etapa de modificación

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. <u>Saponificación de biomasa microbiana portadora de aceite y aceite extraído</u>

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.

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 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, 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, 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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.

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 ebullir 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 CO_2, 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 ajenjo, 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, 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 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 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 "Soaps and Cosmetic Products Produced from Oil-Beaпng 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".

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 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. Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no limitar la invención reivindicada.

VII. EJEMPLOS

EJEMPLO 1

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, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.17 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 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 $\mu Em^{-2}s^{-1}$. Estos cultivos fueron usados para inocular cada cepa a una densidad final de $1x10^5$ 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 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 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.075 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 2 g de extracto de levadura por litro. Los desperdicios de glicerol de la producción de 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 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 (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)

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a 5 x 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 x 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

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 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 que contienen diferentes gliceroles (puro, acidulado o sin acidular) a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante 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 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.

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)
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 x 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 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 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.

EJEMPLO 7

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 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 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 x 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 x 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.

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 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
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 x 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 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 porcentaje de lípido fue calculado a partir de la cantidad de lípido total dividida por el peso seco de célula. Los resultados son mostrados en la Figura 8.

EJEMPLO 10

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 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 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

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 x 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 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

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 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)

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.

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,

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.25 mM, Na_2EDTA 2 mM, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.36 mM, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.21 mM, $ZnCl_2$ 0.37 mM, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0085 mM, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.017 mM, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.78 µM, $ZnSO \cdot 7H_2O$ 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, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.17 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 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

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

(b)

1. SEM + 2% de glucosa

2. SEM + 2% de glicerol grado reactivo

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

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

Cada cepa fue inoculada a medios diferentes a una concentración de 5 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados 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 µl de cultivos fueron recolectados y lavados una vez con el mismo volumen de medios. A cada tubo, se agregaron 5 µl de células lavadas y 200 µl de ácido sulfúrico 18 M. Los tubos fueron incubados a 90°C de baño de agua por 30 minutos, y se agregó 1 ml de reactivo de ácido fosfórico-vanillina a los tubos y 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 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. 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 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 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 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.075 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 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 cavidades

(a), (b)

1. Proteosa + 2% de glucosa
2. Proteosa + 2% glicerol
3. Proteosa + 2% de glicerol acidulado
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 x 10^s 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, el cultivo celular fue medido mediante DCW y el contenido de lípido fue medido mediante análisis de fósforo-vanillina (véase Ejemplo 12). El 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

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.

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
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 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.

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* (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

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 (agregado después de 72 horas)

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

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 de 24 cavidades.

4. Proteosa
5. Proteosa + 0.5% de glucosa
6. Proteosa + 0.5% de xilosa
7. Proteosa + 0.25% de glucosa + 025% de xilosa

Se inoculó *Chlorella protothecoides* #4 (UTEX 31) a medios que contienen diferentes azúcares (glucosa o xilosa) a una concentración de 3 x 10^5 células/ml. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad y agitados mediante agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido de la Gran Bretaña) a 430 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

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.

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 1 x 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 Figura 16.

EJEMPLO 18

Chlorella sobre Sacarosa

Chlorella protothecoides (UTEX 249) fue inoculada a tres matraces de 50 ml de medio de Proteosa con 1% desacarosa ($NaNO_3$ 2.94 mM, K_2HPO_4 0.428 mM, KH_2PO_4 1.28 mM, NaCl 0.427 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.17 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 mM, proteosa peptona 1 g/l) a una densidad celular final de $4x10^5$ células por ml. Se agregó invertasa (Sigma #14504) a dos de los cultivos a 0.01 U/ml y 0.05 U/ml. Todos los tres cultivos fueron cultivados en la oscuridad por ~60 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 $44x10^5$ células por ml, mientras que los matraces de 0.01 U/ml y 0.05 U/ml llegaron a densidades celulares de $1x10^8$ y $3x10^8$, respectivamente. Cada matraz fue verificado en cuanto a contaminación al final del experimento mediante análisis microscópico y todos estuvieron limpios.

EJEMPLO 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 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 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 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
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 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 de melasas/azúcar de 1%, 0.05 unidades/ml de invertasa y $1.0x10^6$ células por ml de *Chlorella protothecoides* en un medio de Proteasa base. Los cultivos fueron numerados como sigue: (1) 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 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 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 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 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 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 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 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.

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 cómo 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.

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 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 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 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 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 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 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.

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	
Elemento (ppm)			
Azufre	121	52	15 ppm max
Fósforo	784	<2	0.001% masa max

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-criotoxantina (mcg/g)	8.45	0.06	
β-crioptoxantina (mcg/g)	19.2	1.80	
α-caroteno (mcg/g)	1.96	0.08	
β-caroteno (mcg/g)	15.0	1.20	
Total de carotenoides identificados (mcg/g)	801	62.2	
Total de carotenoides (mcg/g)	1006	79.3	

EJEMPLO 22

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 crioconservadas 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 pelotilla celular resultante lavada con 1 ml de agua desionizada. El cultivo fue otra vez centrifugado, el sobrenadante descartado y las pelotillas 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 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 en aceites son mostrados en la Tabla 8.

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

Especie	Cepa	% de aceite	Cepa # (Figuras 28 y 29a-i)
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
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
Prototheca moriformis	UTEX 1435	27.17	12
Chlorella minutissima	UTEX 2341	31.39	13
Chlorella protothecoides	UTEX 250	34.24	1
Chlorella protothecoides	UTEX 25	40.00	2
Chlorella protothecoides	CCAP 211/8D	47.56	3
Chlorella luteoviridis	SAG 2203	37.88	18
Chlorella vulgaris	CCAP 211/11K	35.85	19
Chlorella reisiglii	CCAP 11/8	31.17	20
Chlorella ellipsoidea	CCAP 211/42	32.93	21
Chlorella saccharophila	CCAP 211/31	34.84	22

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 pelotillas 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 pelotilla resultante fue luego lavada dos veces con etanol al 70%, seguido por un lavado final con etanol al 100%. Las pelotillas 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 µl 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 µl, fueron ajustadas como sigue. Diez µl de mezcla maestra iProof HF 2 x (BIO-RAD) fueron agregados a 0.4 µl 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 µl 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 µl de ADN total diluidos y 3.2 µl de dH_2O

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 µl de Tris 10 mM, pH 8.0, fueron agregados a cada reacción, seguido por extracción con 40 µl 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 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 secuencias adjunto.

EJEMPLO 24

Diversidad de Cadenas de Lípido en Especies de Algas

Cultivos de varias especies de algas fueron 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 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 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 pelotilla resultante fue enjuagada con agua para remover cualquier sal o medio residual; las pelotilla 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 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.

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 trebouxiodes	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 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), 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.

Tabla 10. Componentes de jabón celular compuesto directamente de biomasa

Componente	Cantidad
Biomasa (células enteras)	10-60%
KOH	1-5%
Glicerina	5-25%
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.

EJEMPLO 26

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 extracte 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 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 contienen proporciones relativamente más bajas de carotenoides contaminantes, en comparación con los lípidos extraídos con hexano, debido a la eficiencia disminuida con la cual tales compuestos son extraídos de la biomasa microbiana utilizando el procedimiento sin solventes.

EJEMPLO 28

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

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%
UTEX 1439	Prototheca moriformis	0%	0%	0%	27%	0%	3%	57%	13%	0%
UTEX 1441	Prototheca moriformis	0%	0%	1%	28%	1%	3%	54%	12%	1%
UTEX 1435	Prototheca moriformis	0%	0%	1%	26%	0%	3%	55%	12%	2%
UTEX 1437	Prototheca moriformis	0%	0%	0%	25%	0%	2%	57%	12%	3%

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*.

EJEMPLO 29

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

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.

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

Luteina	0.382 mcg/g
Zeaxantina	1.23 mcg/g
Cis-Luteína/Zeaxantina	0.446 mcg/g
Alfa-criootpxantina	Ninguno detectado
Beta-criptoxantina	Ninguno detectado
Licopeno	Ninguno detectado
Alfa-caroteno	0.057 mcg/g
Cis-beta-caroteno	0.127 mcg/g
Fitoflueno	0.069 mcg/g
Fitoeno	0.689 mcg/g
Carotenoides identificados totales	3.70 mcg/g
Clorofila	<0.01 mg/kg

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 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 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 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: 6).

EJEMPLO 31

Selección de Utilización de Sorgo

Cepas: Las siguientes cepas fueron usadas en la 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 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 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 (Lynnville, Iowa) con un perfil de azúcar 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 biomasa microbiana que contiene lípidos, caracterizado porque comprende:

(a) cultivar una población de microbios;

(b) cosechar la biomasa microbiana, en donde la biomasa contiene por lo menos 5% en peso seco de célula de lípido; y

(c) someter la biomasa a una reacción química que modifica covalentemente por lo menos 1% del lípido.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además separar el lípido modificado covalentemente de otros componentes de la biomasa.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la separación comprende una separación de fases, mediante lo cual los lípidos modificados covalentemente forman una fase no acuosa ligera y los componentes de la biomasa forman una o más fases más pesadas.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la biomasa es sometida a la reacción química sin una etapa de enriquecimiento previo que incrementa la proporción de los lípidos al material sin lípido por más del 50% en peso.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la biomasa cosechada no es sometida a

tratamientos diferentes a remover el agua o lisis antes de la reacción química.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la biomasa es sometida a la reacción química con una etapa de enriquecimiento previo que incrementa la proporción de los lípidos al peso seco de los microbios.

7. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque etapa (c) comprende transesterificar la biomasa para generar una fase lipofílica que alquil ésteres de ácido graso y una fase hidrofílica que contiene material celular y glicerol.

8. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además remover el agua de la biomasa antes de someter la biomasa a la reacción química.

9. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (c) incluye poner en contacto la biomasa con una enzima para catalizar la reacción química.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la biomasa cosechada comprende un contenido de lípido de por lo menos 30% en peso de célula seca.

11. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además separar una fase lipofílica que contiene los lípidos modificados covalentemente del material celular hidrofílico de la biomasa.

12. El método de conformidad con la reivindicación 1,

caracterizado porque los microbios son seleccionados del grupo que consiste de bacteria, cianobacteria, microalgas eucariónticas, levadura oleaginosa y hongos.

13. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque los microbios son seleccionados del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1 y las microalgas tienen por lo menos 85% de identidad de secuencia genómica de rARN 23S con una o más secuencias del grupo que consiste de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29; la levadura oleaginosa enlistada en la Tabla 2 y los hongos enlistados en la Tabla 3.

14. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque los microbios son una especie del género *Chlorella*, *Parachlorella* o *Prototheca*.

15. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la cantidad de calcio y magnesio combinados en peso en la fase lipofílica no es mayor de 5 partes por millón, en donde la cantidad de fósforo en las fase lipofílica no es mayor de 0.001% en masa, la cantidad de azufre en la fase lipofílica no es mayor de 15 partes por millón, en

donde la cantidad de potasio y sodio combinados en peso en la fase lipofílica no es mayor de 5 partes por millón, y/o en donde el contenido de carotenoide total de la fase lipofílica no es mayor de 100 microgramos de carotenoide por gramo.

16. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque comprende además someter a disrupción la biomasa antes de la transesterificación de la biomasa.

17. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque dos especies o cepas distintas de microbios son cultivadas separadamente y la biomasa de ambos cultivos es mezclada antes de la etapa (c).

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque por lo menos dos de las cepas distintas de microbios tienen diferentes perfiles de glicerolípido.

19. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (c) es seleccionada de las etapas de hidrogenar la biomasa para saturar por lo menos parcialmente enlaces insaturados en el lípido, interesterificación de la biomasa para generar una mezcla de glicerolípidos que tienen un arreglo modificado de constituyentes de ácido graso en relación con el lípido en la biomasa cosechada, hidroxilar la biomasa para generar lípidos hidroxilados, esterificar por lo menos una porción de los lípidos hidroxilados para generar estolatos, hidrolizar la biomasa para generar ácidos grasos libres a

partir del lípido.

20. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (c) comprende:

(i) desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno en presencia de un catalizador;

(ii) isomerización en presencia de hidrógeno en presencia de un catalizador; y

(iii) remoción de gases y compuestos de nafta.

21. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (c) comprende saponificar la biomasa para generar sales de ácido graso del lípido.

22. Una composición caracterizada porque contiene más de una fase que comprende: (a) una fase más ligera que contiene alquil ésteres de ácido graso; y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana.

23. La composición de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque la biomasa microbiana es seleccionada del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1, la levadura oleaginosa enlistada en la Tabla 2, los hongos enlistados en la Tabla 3.

24. La composición de conformidad con la reivindicación 23, caracterizada porque la cantidad de calcio y magnesio combinadas en peso, en la fase más ligera, no es mayor de 5 partes por millón, en donde la cantidad de fósforo en la fase más ligera no es mayor de 0.001% en masa, en donde la

cantidad de azufre en la fase más ligera no es mayor de 15 partes por millón, en donde la cantidad de potasio y sodio combinadas en peso en la fase más ligera no es mayor de 5 partes por millón, y/o en donde el contenido de carotenoide total de la fase más ligera no es mayor de 100 microgramos de carotenoide por gramo.

25. Una composición caracterizado porque contiene más de una fase seleccionada del grupo de composiciones que comprenden: una composición que tiene una fase más ligera que contiene lípidos completamente saturados y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana; una composición que tiene 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 tiene una fase más ligera que contiene lípidos hidroxilados y por lo menos una fase más pesada que contiene biomasa microbiana; y una composición que tiene una fase más ligera que contiene ácidos grasos libres y una fase más pesada que contiene biomasa microbiana.

26. Un método para la fabricación de un jabón, caracterizado porque comprende:

(a) cultivar una población de microbios;

(b) cosechar biomasa microbiana, en donde la biomasa contiene por lo menos 5% de lípidos en DCW, en los que se incluyen glicerolípidos o ésteres de ácido graso; y

(c) someter la biomasa a una reacción de hidrólisis alcalina para producir un jabón de la conversión química de por lo menos una porción de los glicerolípidos o ésteres de ácido graso a sales de ácido graso.

27. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque comprende además separar sustancialmente las sales de ácido graso de otros componentes de la biomasa.

28. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque los microbios son seleccionados del grupo que consiste de las microalgas enlistadas en la Tabla 1, la levadura oleaginosa enlistada en la Tabla 2, y los hongos enlistados en la Tabla 3.

29. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque dos cepas o especies distintas de microbios son cultivados separadamente y la biomasa ambos cultivos es mezclada antes de la etapa (c).

30. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque por lo menos dos de cepas distintas de microbios tienen perfiles de glicerolípido diferentes.

31. Una composición caracterizada porque comprende aceite saponificado derivado de la hidrólisis alcalina de biomasa o aceite extraído producido al cultivar una población de microbios.

32. La composición de conformidad con la

reivindicación 31, caracterizado porque la composición comprende además por lo menos un aceite seleccionado de soya, colza, canola, palma, centro de palma, coco, maíz, desperdicio vegetal, árbol de sebo, girasol, semilla de algodón, grasa de pollo, sebo de res, sebo porcino, microalgas, macroalgas, Cupea, lino, cacahuate, grasa blanca de elección, manteca, Camelina sativa, semilla de mostaza, nuez de la India, avena, lupina, kenaf, caléndula, cáñamo, café, linaza (lino), avellana, euforbia, semilla de calabaza, cilantro, camelia, sésamo, cártamo, arroz, árbol de aceite de tung, cocoa, copra, ciruela amapola, semillas de ricino, pecana, jojoba, jatrofa, macadamia, nueces de Brasil, aguacate, un aceite de fósil o una fracción destilada del mismo y opcionalmente uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste de aceites esenciales, aceites de fragancia, aceites de sabor, botánicos, extractos, extractos de CO_2, arcillas, colorantes, dióxido de titanio, micas, hierbas de tinte, agentes de deslizamiento, exfoliantes, semillas de fruta, fibras, polvos de grano, harinas de nuez, harinas de semilla, perlas de aceite, perlas de cera, hierbas, hidrosoles, vitaminas, polvos de leche, conservadores, antioxidantes, tocoferoles, sales, azúcares, aceites vegetales, ceras, glicerina, vegetales marinos, aceites nutritivos, aceites humectantes, mantequillas vegetales, propilenglicol, parabenes, miel, cera de abejas, aloe, polisorbato, almidón de maíz, polvo de cocoa, polvo de coral, humectantes, gomas,

agentes emulsificantes y espesantes.

33. La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque los microbios son seleccionados del grupo que consiste de bacterias, cianobacterias, microalgas eucariónticas, levadura oleaginosa y hongos.

34. La composición de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada porque los microbios son una especie del género *Chlorella*, *Parachlorella* o *Prototheca*.

35. La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque la biomasa o aceite extraído comprende una mezcla de biomasa o una mezcla de aceites extraídos de dos cepas o especies distintas de microbios que han sido cultivadas separadamente.

36. La composición de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque por lo menos dos de las cepas distintas de microbios tienen perfiles de glicerolípido diferentes.

37. La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque componentes derivados de la biomasa o aceite extraído constituyen por lo menos 50% de la masa total de la composición.

38. La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque comprende menos de 50 microgramos de carotenoide por gramo de aceite saponificado.

39. La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el aceite saponificado es saponificado de ésteres de ácido graso que comprende por lo menos 10% de C16.

40. La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque comprende menos de 0.1 mg/kg de clorofila.

41. Una composición caracterizada porque comprende un aceite extraído de microalgas, en donde el aceite contiene menos de 0.01 mg/kg de clorofila.

42. La composición de conformidad con la reivindicación 41, caracterizada porque la microalga es del género *Prototheca*.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

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.

Figura 1

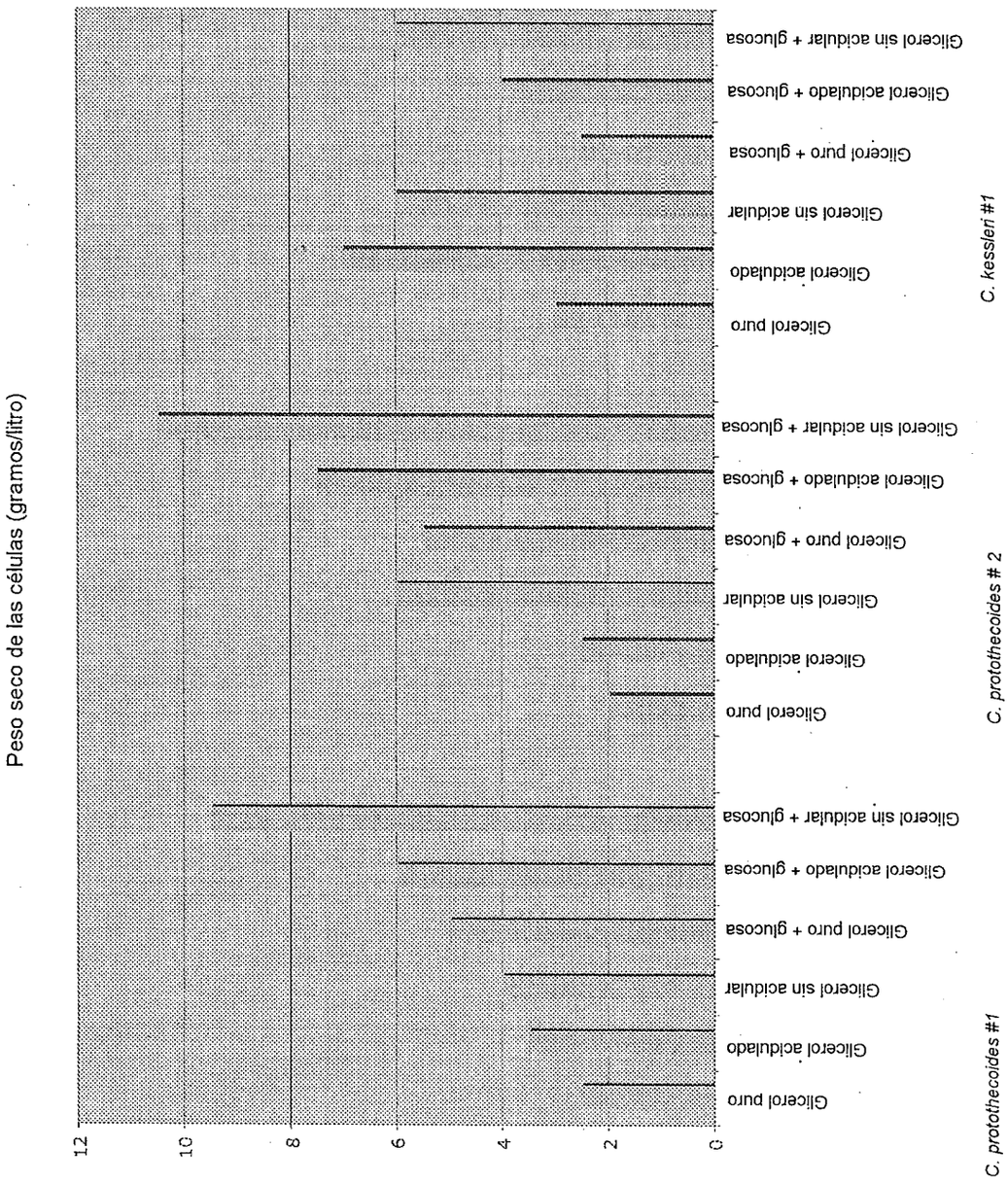

Peso seco de las células (gramos/litro)
12
10
8
6
4
2
0
Glicerol puro
Glicerol acidulado
Glicerol sin acidular
Glicerol puro + glucosa
Glicerol acidulado + glucosa
Glicerol sin acidular + glucosa
C. protothecoides #1
Glicerol puro
Glicerol acidulado
Glicerol sin acidular
Glicerol puro + glucosa
Glicerol acidulado + glucosa
Glicerol sin acidular + glucosa
C. protothecoides # 2
Glicerol puro
Glicerol acidulado
Glicerol sin acidular
Glicerol puro + glucosa
Glicerol acidulado + glucosa
Glicerol sin acidular + glucosa
C. kessleri #1

Figura 2

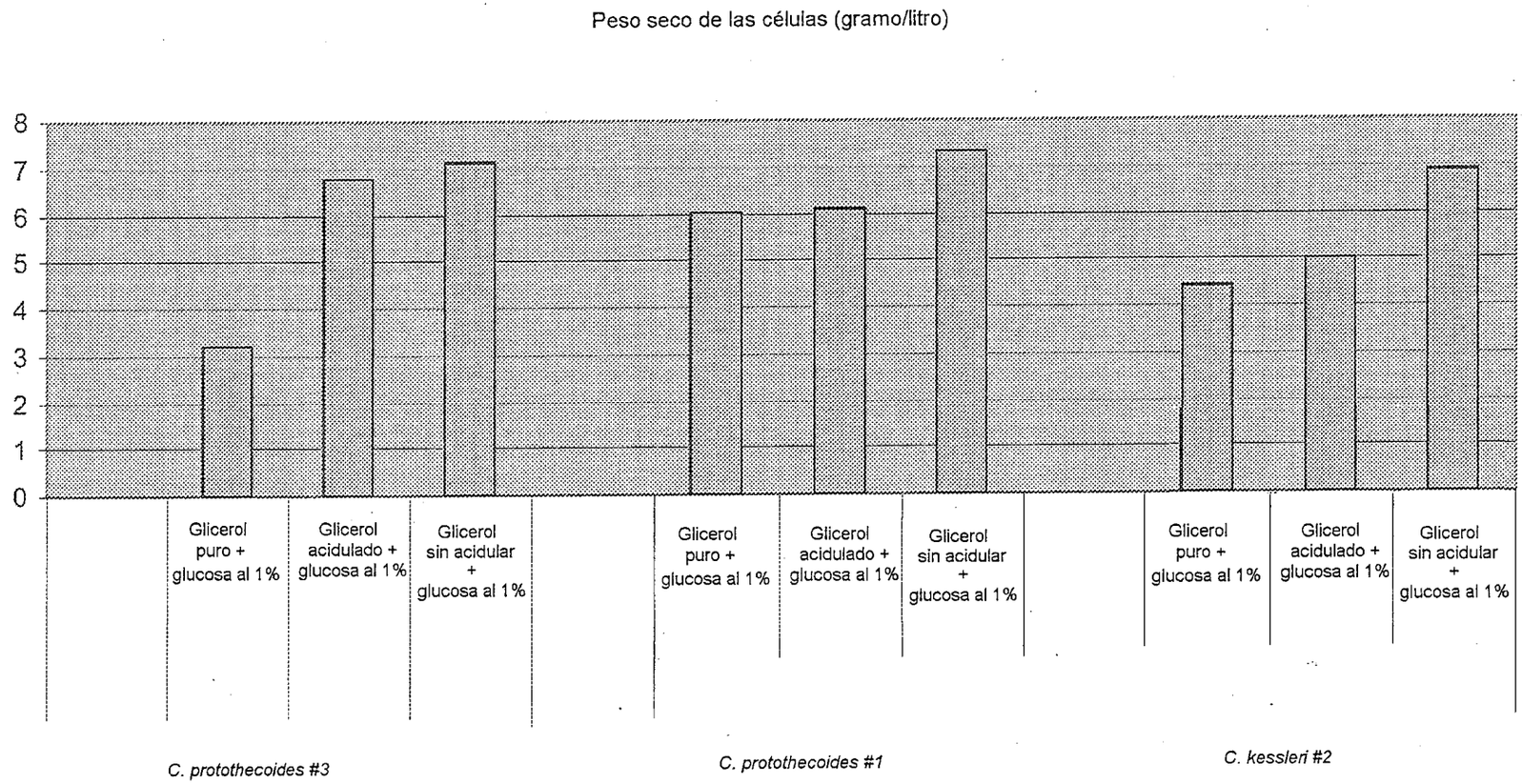

Peso seco de las células (gramo/litro)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Glicerol puro + glucosa al 1%
Glicerol acidulado + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular + glucosa al 1%
Glicerol puro + glucosa al 1%
Glicerol acidulado + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular + glucosa al 1%
Glicerol puro + glucosa al 1%
Glicerol acidulado + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular + glucosa al 1%
C. prototheco ides #3
C. prototheco ides #1
C. kessleri #2

Figura 3

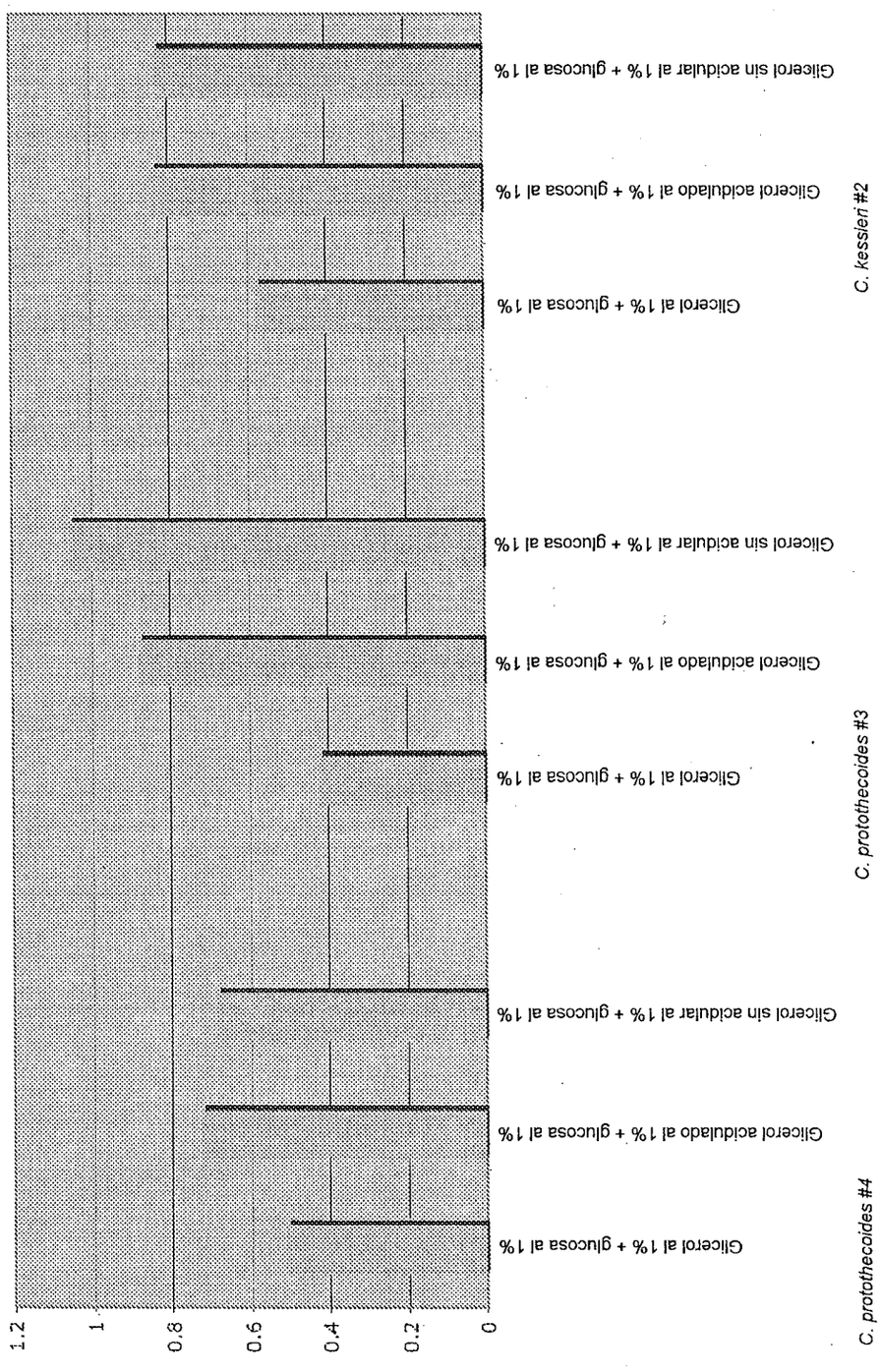

Lípido a OD de 530 nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
C. protothecoides #4
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
C. protothecoides #3
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
C. kessleri #2

Figura 4

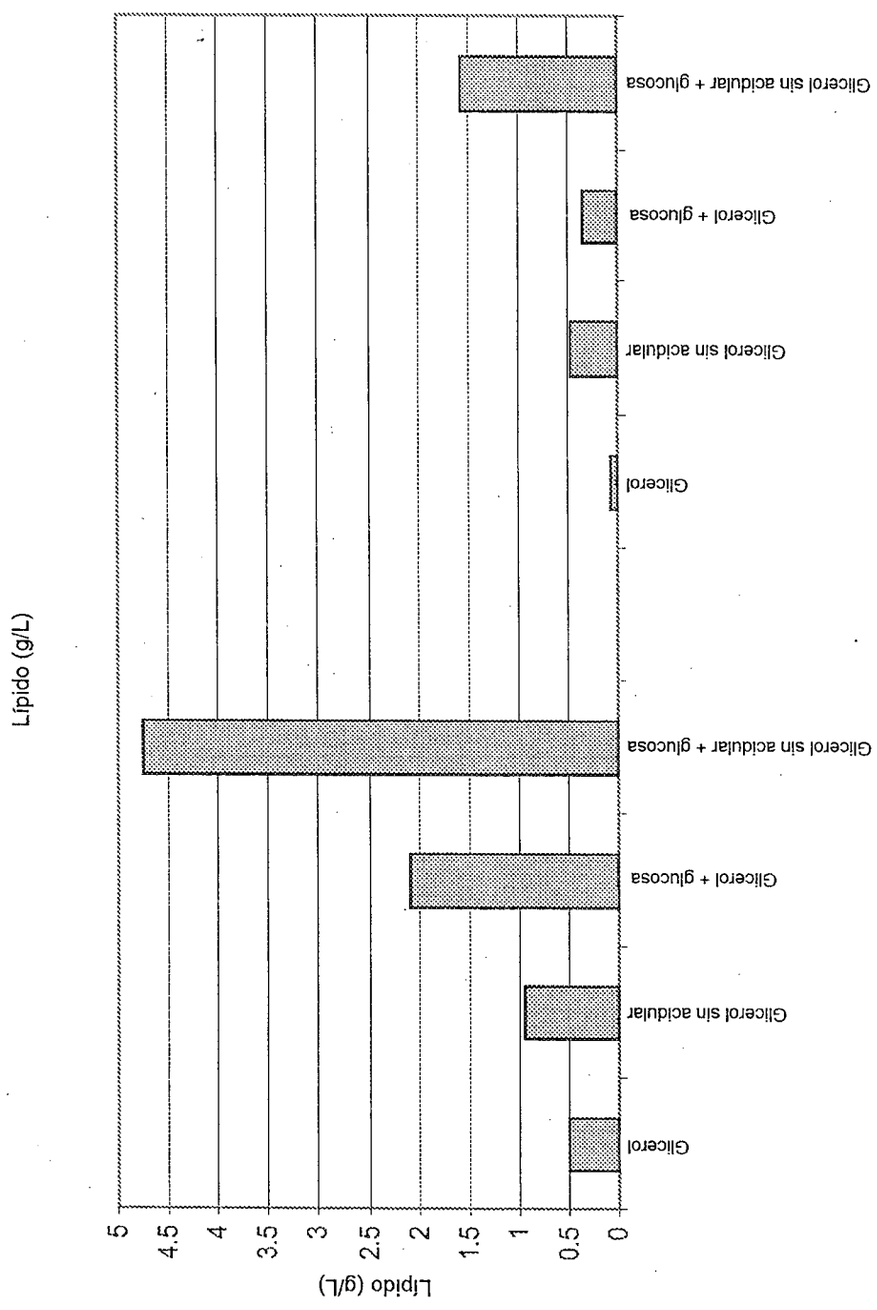

Lípido (g/L)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Glicerol
Glicerol sin acidular
Glicerol + glucosa
Glicerol sin acidular + glucosa
Glicerol
Glicerol sin acidular
Glicerol + glucosa
Glicerol sin acidular + glucosa
C. protothecoides #2
C. kessleri #1

Figura 5

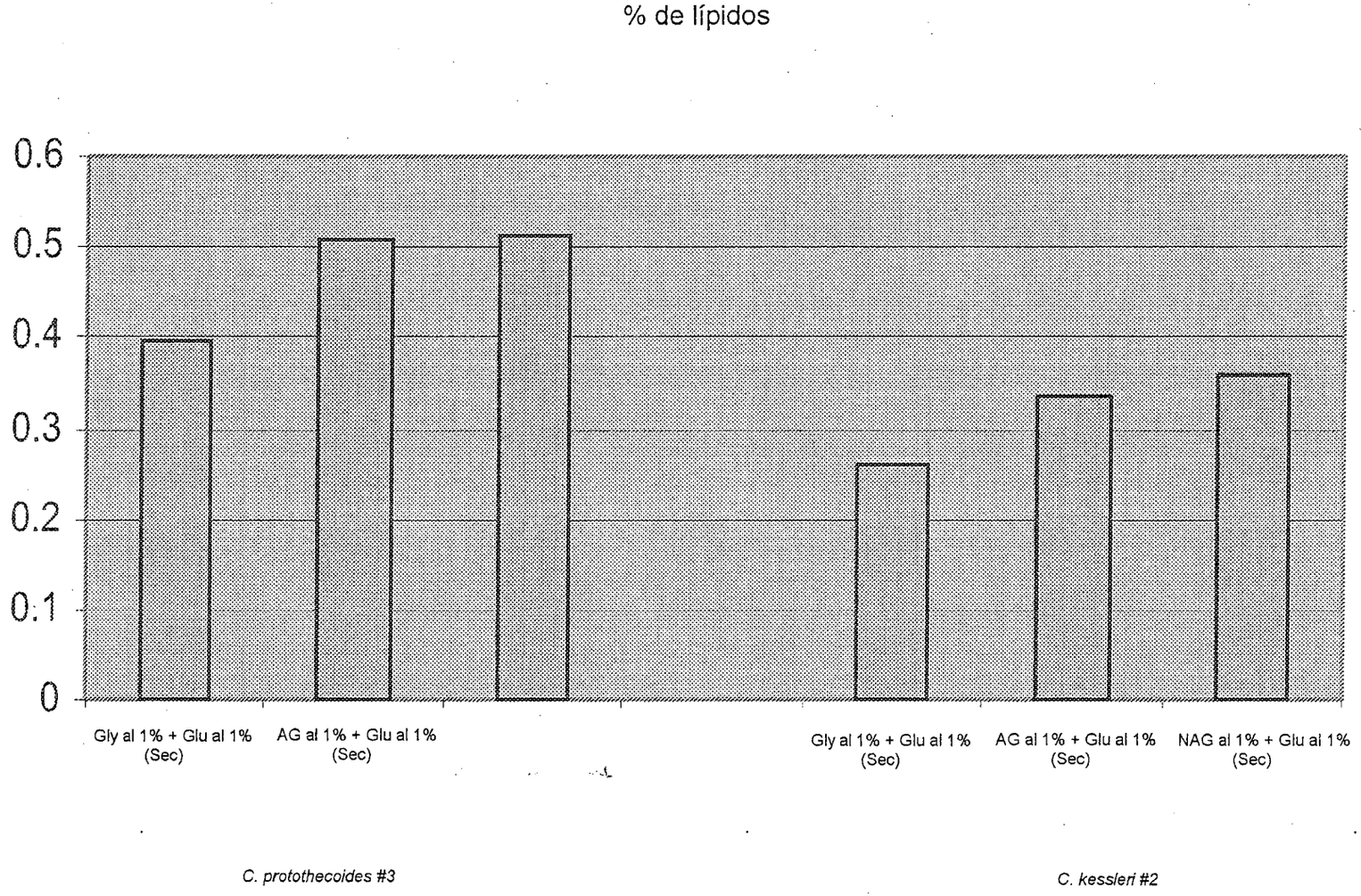

% de lípidos
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Gly al 1% + Glu al 1% (Sec)
AG al 1% + Glu al 1% (Sec)
Gly al 1% + Glu al 1% (Sec)
AG al 1% + Glu al 1% (Sec)
NAG al 1% + Glu al 1% (Sec)
C. protothecoides #3
C. kessleri #2

Figura 6

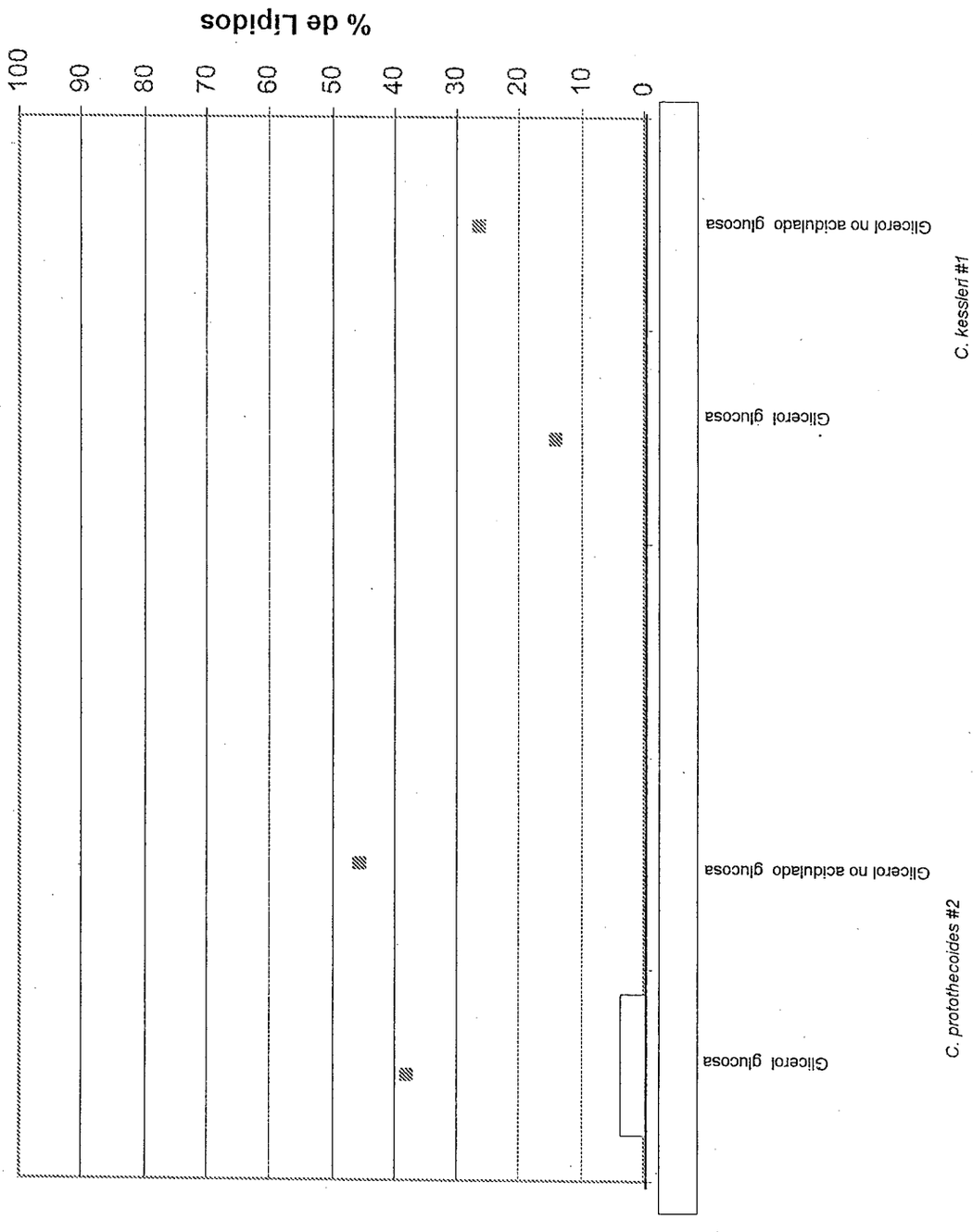

% de Lipidos
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Glicerol glucosa
Glicerol no acidulado glucosa
C. protothecoides #2
Glicerol glucosa
Glicerol no acidulado glucosa
C. kessleri #1

Figura 7

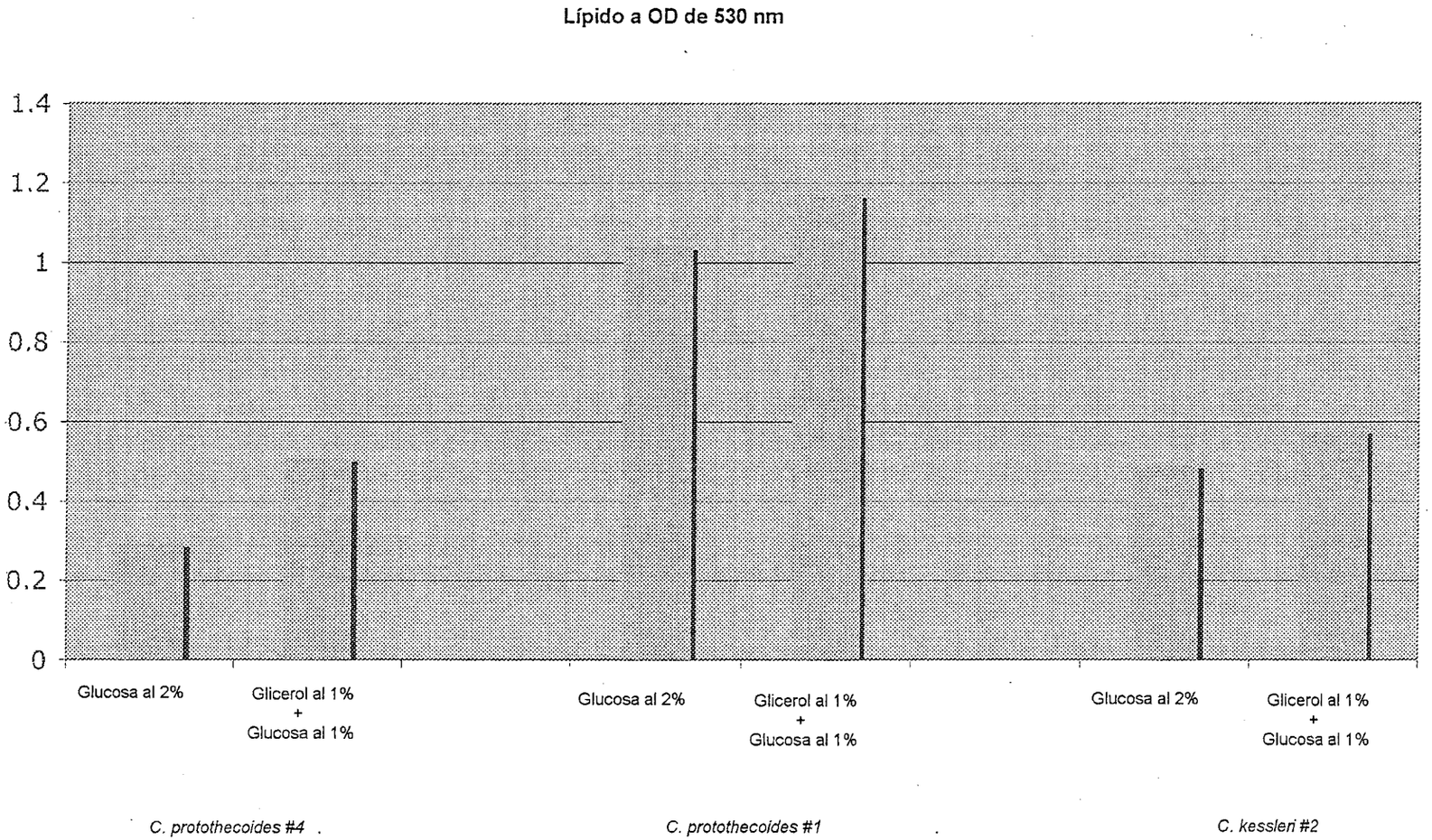

Lípido a OD de 530 nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Glucosa al 2%
Glicerol al 1% + Glucosa al 1%
Glucosa al 2%
Glicerol al 1% + Glucosa al 1%
Glucosa al 2%
Glicerol al 1% + Glucosa al 1%
C. prototheco ides #4
C. prototheco ides #1
C. kessleri #2

Figura 8

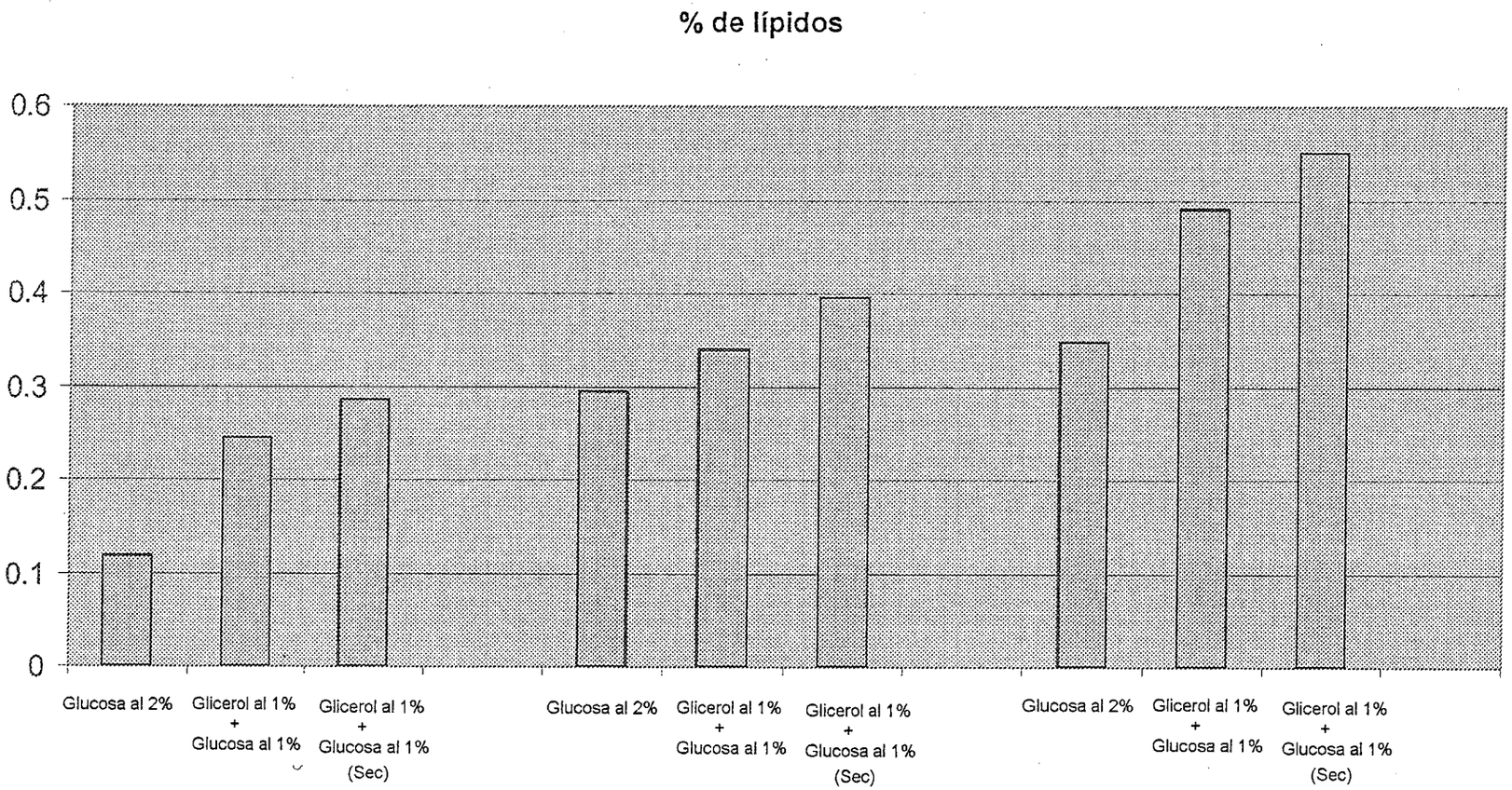

% de lípidos
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Glucosa al 2%
Glicerol al 1% + Glucosa al 1%
Glicerol al 1% + Glucosa al 1% (Sec)
Glucosa al 2%
Glicerol al 1% + Glucosa al 1%
Glicerol al 1% + Glucosa al 1% (Sec)
Glucosa al 2%
Glicerol al 1% + Glucosa al 1%
Glicerol al 1% + Glucosa al 1% (Sec)
C. prototheçoides #4
C. prototheçoides #3
C. prototheçoides #1

Figura 9

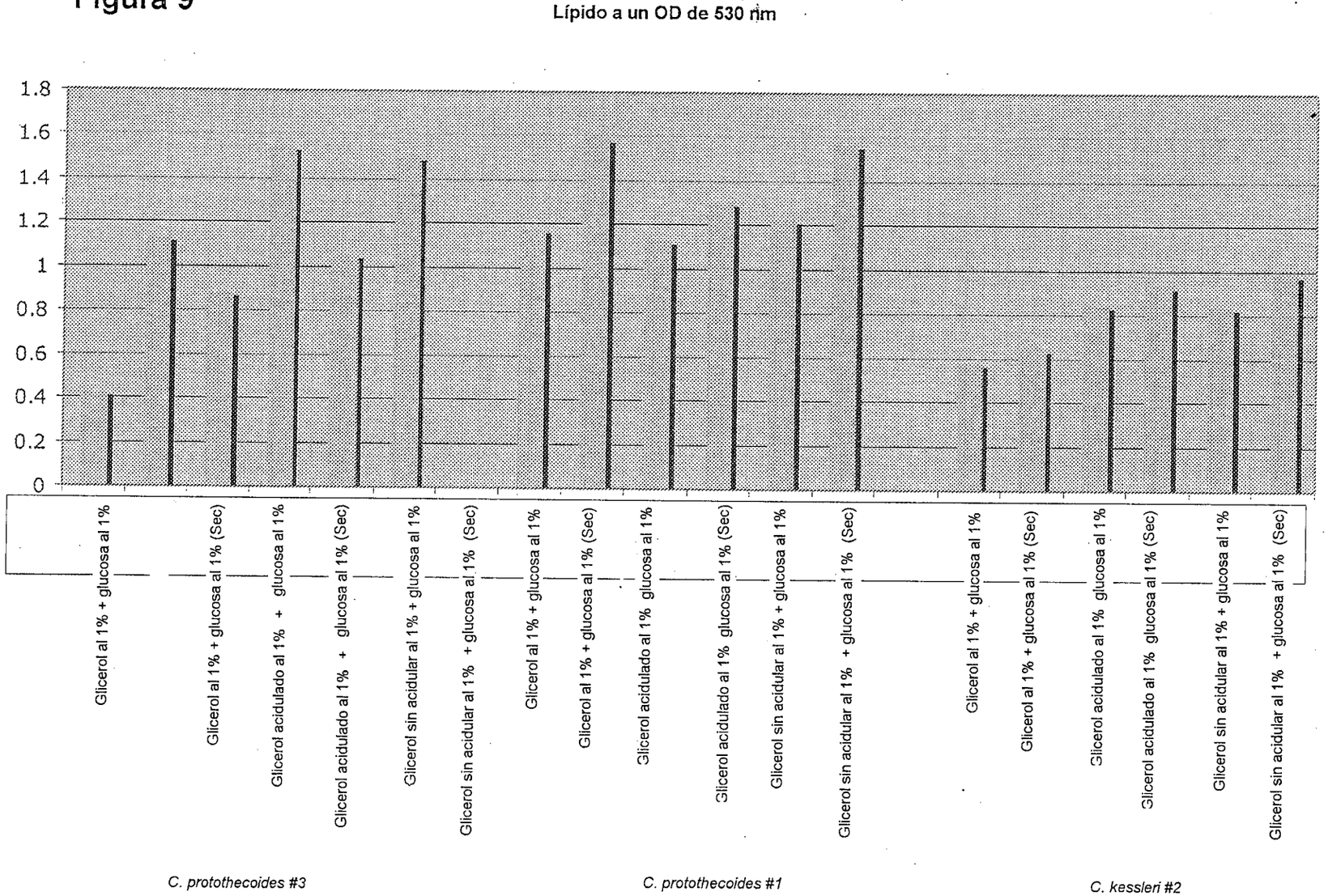

Lípido a un OD de 530 nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol acidulado al 1% glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% glucosa al 1% (Sec)
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol acidulado al 1% glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% glucosa al 1% (Sec)
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (Sec)
C. prototheco ides #3
C. prototheco ides #1
C. kessleri #2

Figura 10

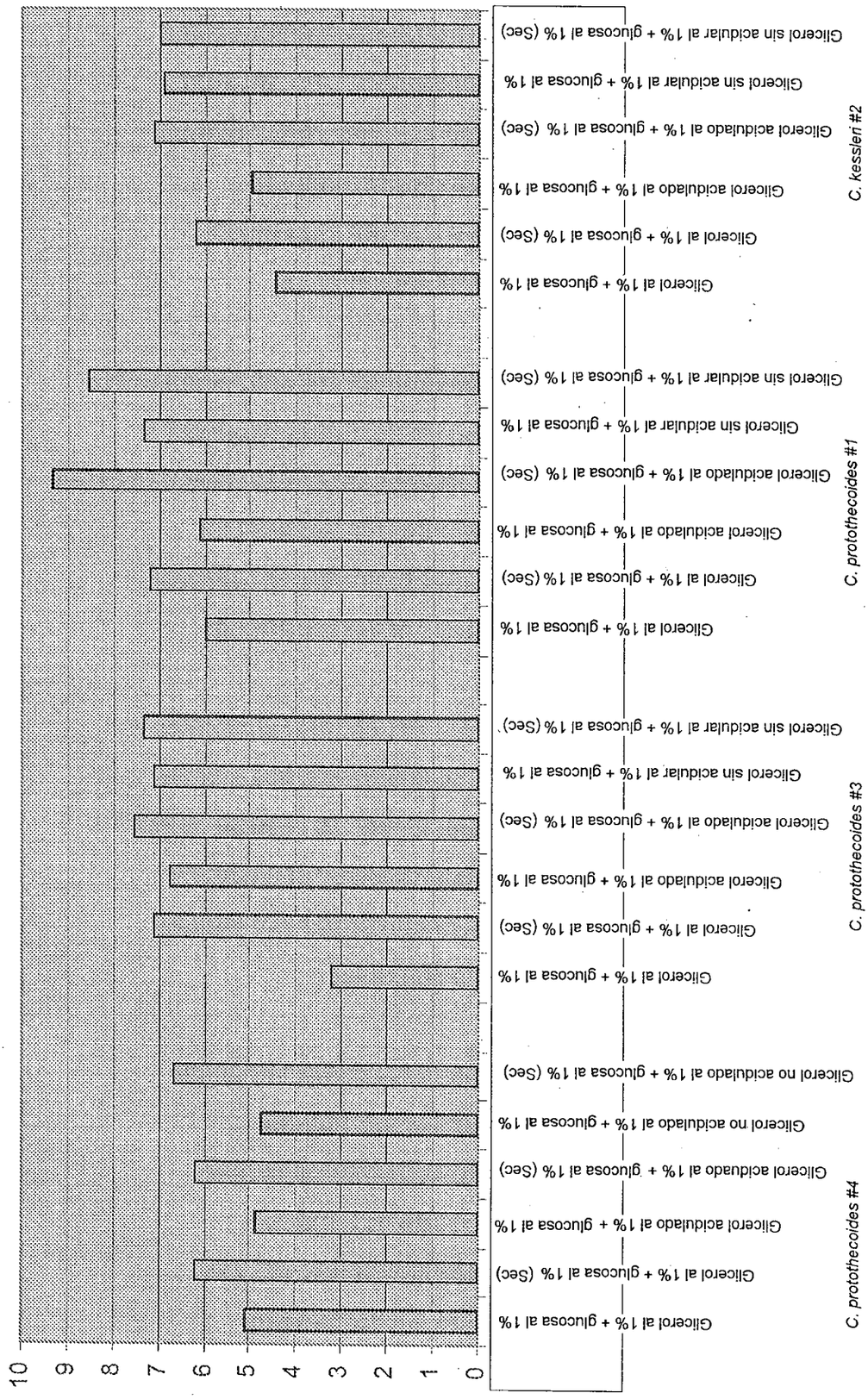
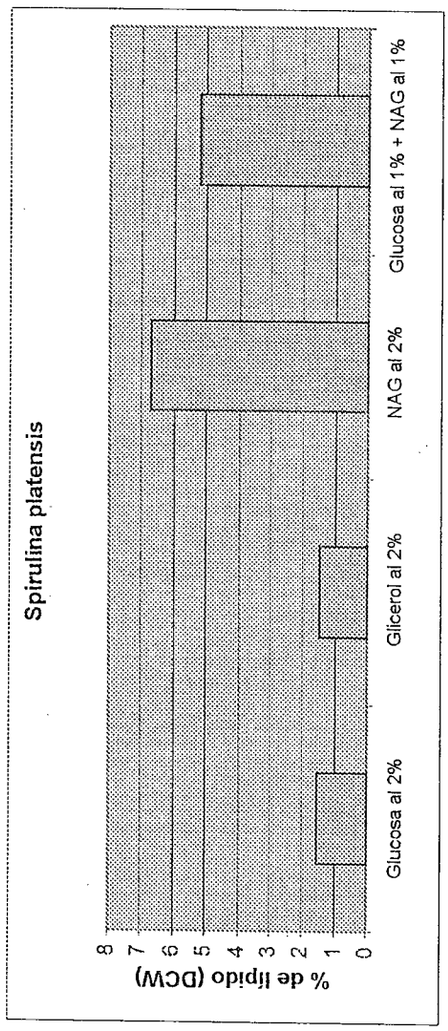
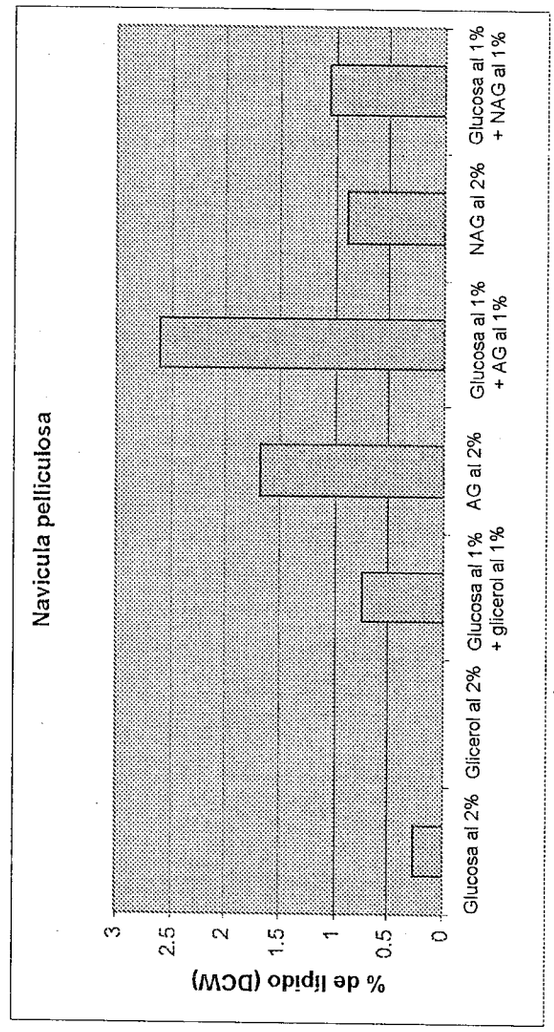

Peso seco de las células (gramos/Litro)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
C. prototthecoides #4
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol no acidulado al 1% + glucosa al 1%
Glicerol no acidulado al 1% + glucosa al 1% (Sec)
C. prototthecoides #3
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (Sec)
C. prototthecoides #1
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (Sec)
C. kessleri #2
Glicerol al 1% + glucosa al 1%
Glicerol al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1%
Glicerol acidulado al 1% + glucosa al 1% (Sec)
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1%
Glicerol sin acidular al 1% + glucosa al 1% (Sec)

Figura 11


Spirulina platensis
% de lípido (DCW)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Glucosa al 2%
Glicerol al 2%
NAG al 2%
Glucosa al 1% + NAG al 1%

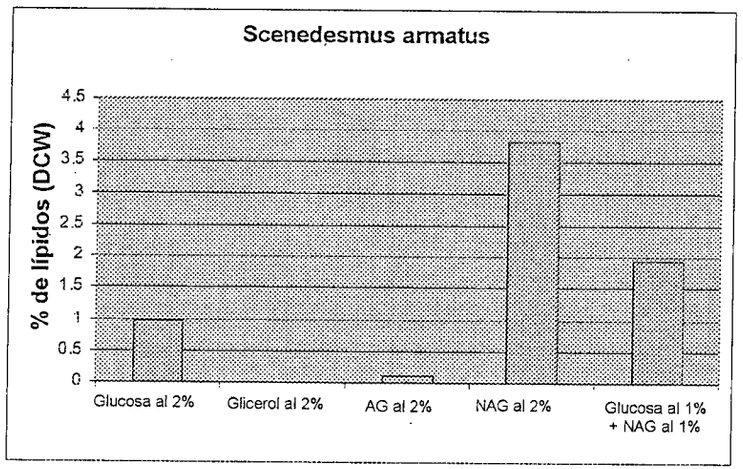
(a)


Navicula pelliculosa
% de lípido (DCW)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
Glucosa al 2%
Glicerol al 2%
Glucosa al 1% + glicerol al 1%
AG al 2%
Glucosa al 1% + AG al 1%
NAG al 2%
Glucosa al 1% + NAG al 1%

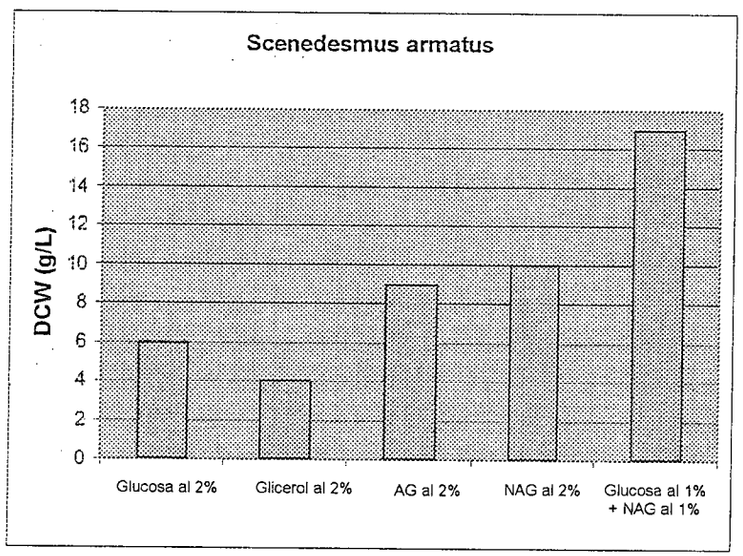
(b)

Figura 12

(a)


Scenedesmus armatus
% de lípidos (DCW)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Glucosa al 2%
Glicerol al 2%
AG al 2%
NAG al 2%
Glucosa al 1% + NAG al 1%

(b)


Scenedesmus armatus
DCW (g/L)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Glucosa al 2%
Glicerol al 2%
AG al 2%
NAG al 2%
Glucosa al 1% + NAG al 1%

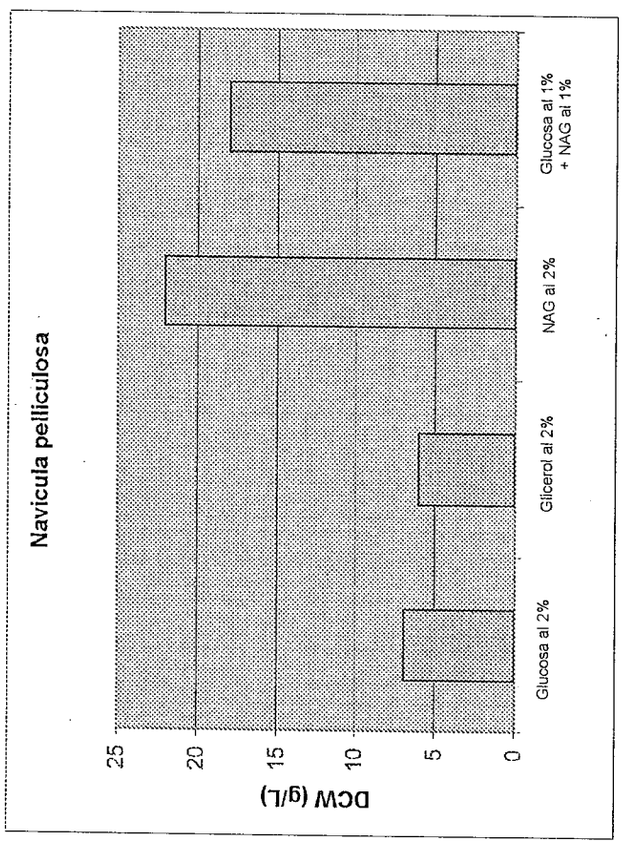
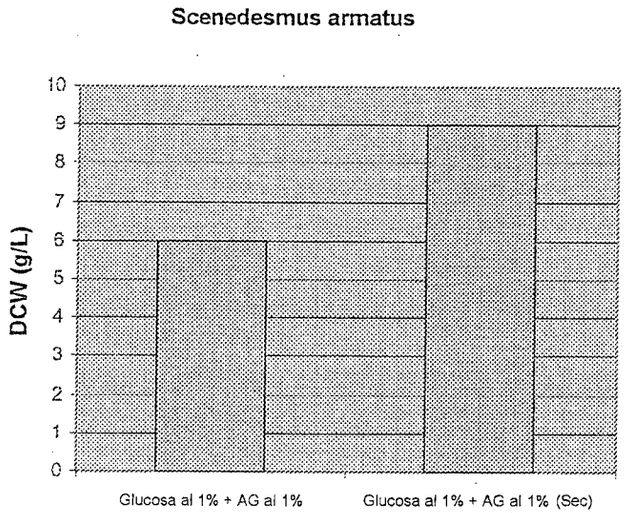

Navicula pelliculosa
DCW (g/L)
0
5
10
15
20
25
Glucosa al 2%
Glicerol al 2%
NAG al 2%
Glucosa al 1%
+ NAG al 1%

Figura 13

Figura 14

(a)


Scenedesmus armatus
DCW (g/L)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Glucosa al 1% + AG al 1%
Glucosa al 1% + AG al 1% (Sec)

(b)

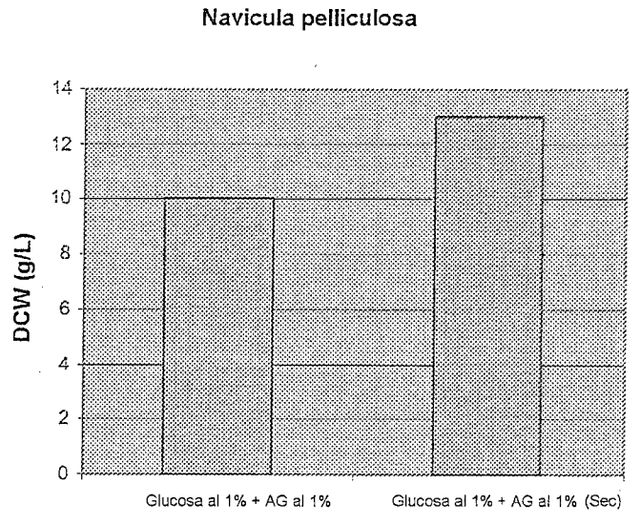

Navicula pelliculosa
DCW (g/L)
0
2
4
6
8
10
12
14
Glucosa al 1% + AG al 1%
Glucosa al 1% + AG al 1% (Sec)

Figura 15

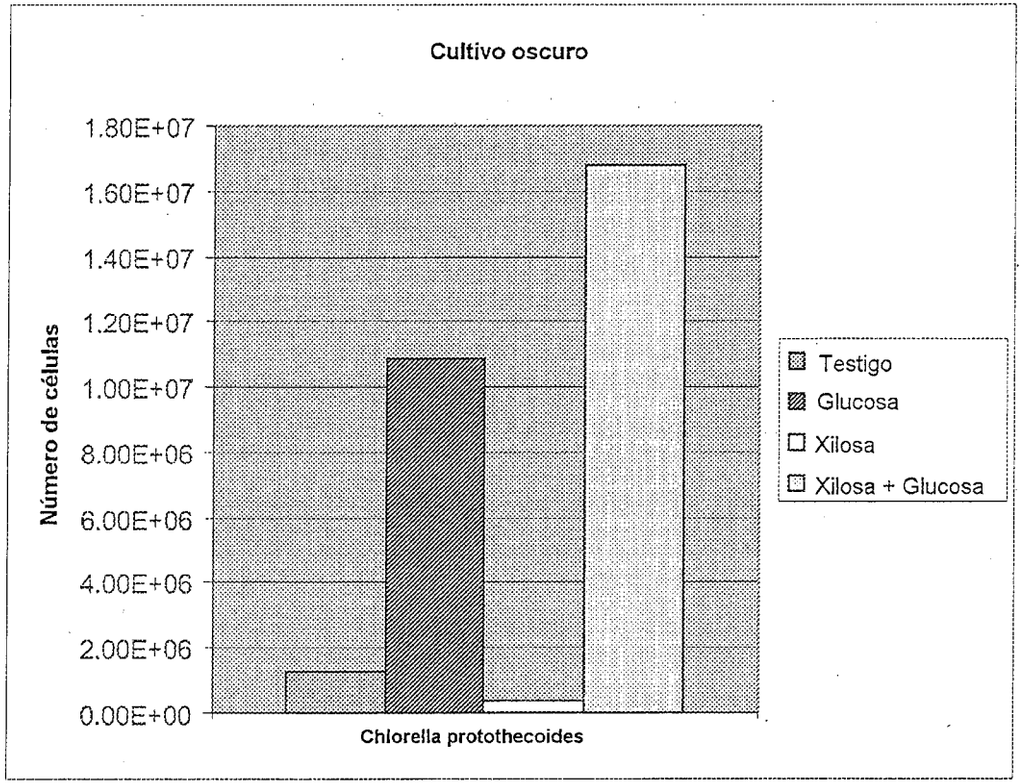

Cultivo oscuro
1.80E+07
1.60E+07
1.40E+07
1.20E+07
1.00E+07
8.00E+06
6.00E+06
4.00E+06
2.00E+06
0.00E+00
Número de células
Chlorella protothecoides
Testigo
Glucosa
Xilosa
Xilosa + Glucosa

Figura 16

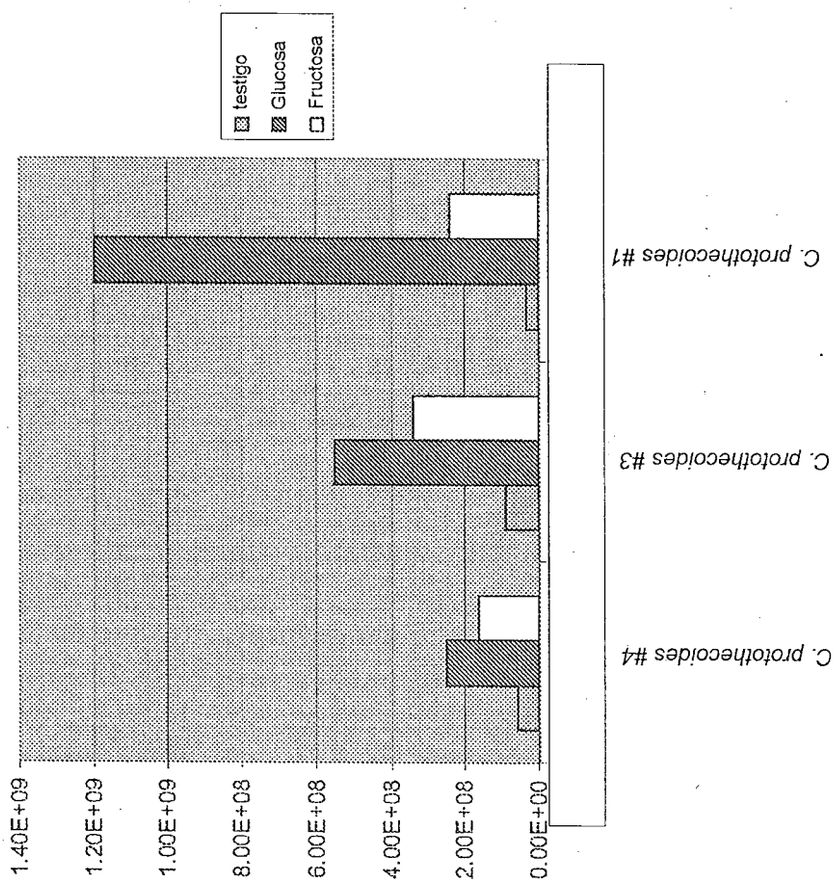
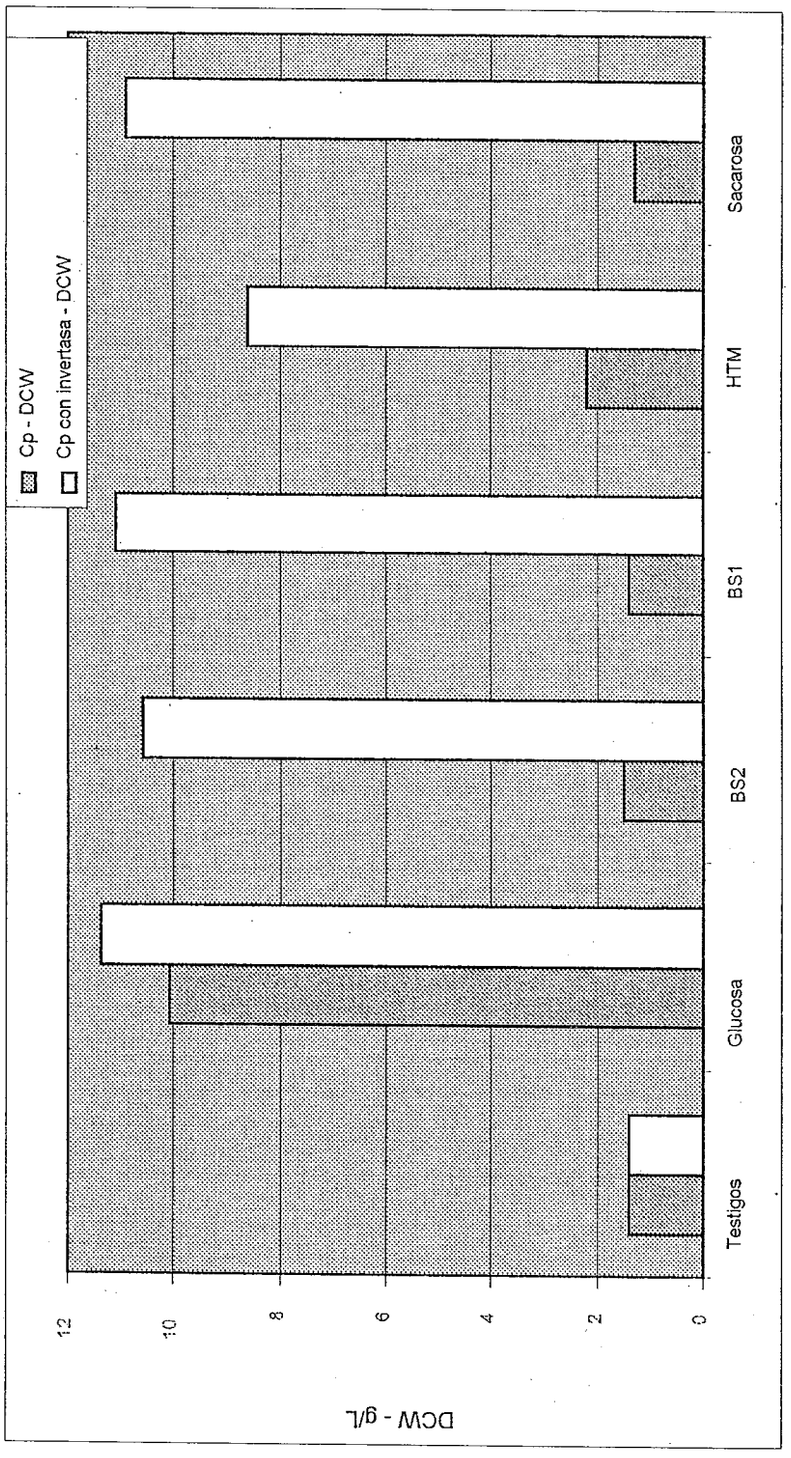

testigo
Glucosa
Fructosa
1.40E+09
1.20E+09
1.00E+09
8.00E+08
6.00E+08
4.00E+08
2.00E+08
0.00E+00
Densidad celular (células/ml)
C. protothecoides #4
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1

Figura 17


Cp - DCW
Cp con invertasa - DCW
DCW - g/L
0
2
4
6
8
10
12
Testigos
Glucosa
BS2
BS1
HTM
Sacarosa
Materia prima de alimentación (melasa/azúcar)

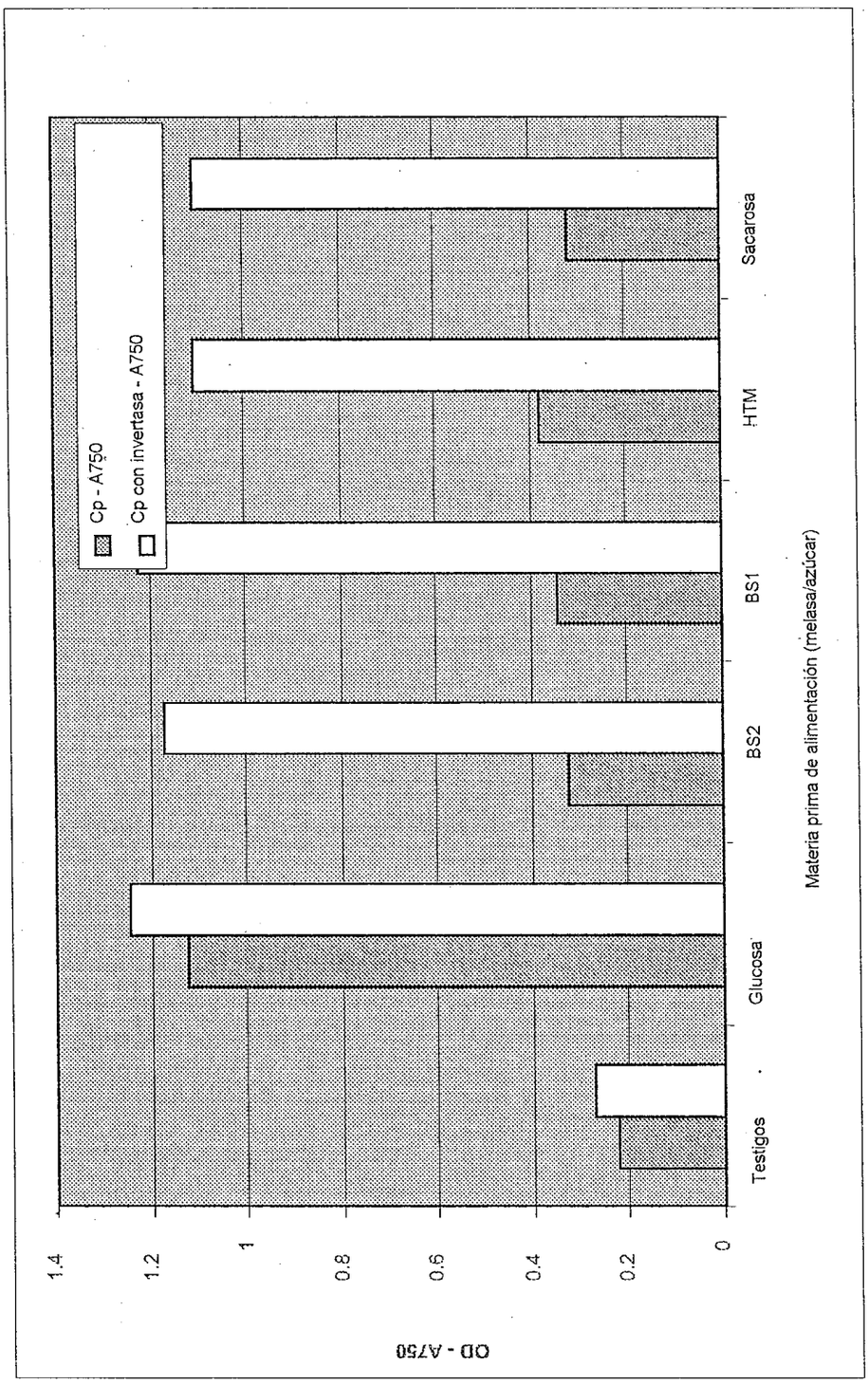

Cp - A750
Cp con invertasa - A750
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD - A750
Testigos
Glucosa
BS2
BS1
HTM
Sacarosa
Materia prima de alimentación (melasa/azúcar)

Figure 18

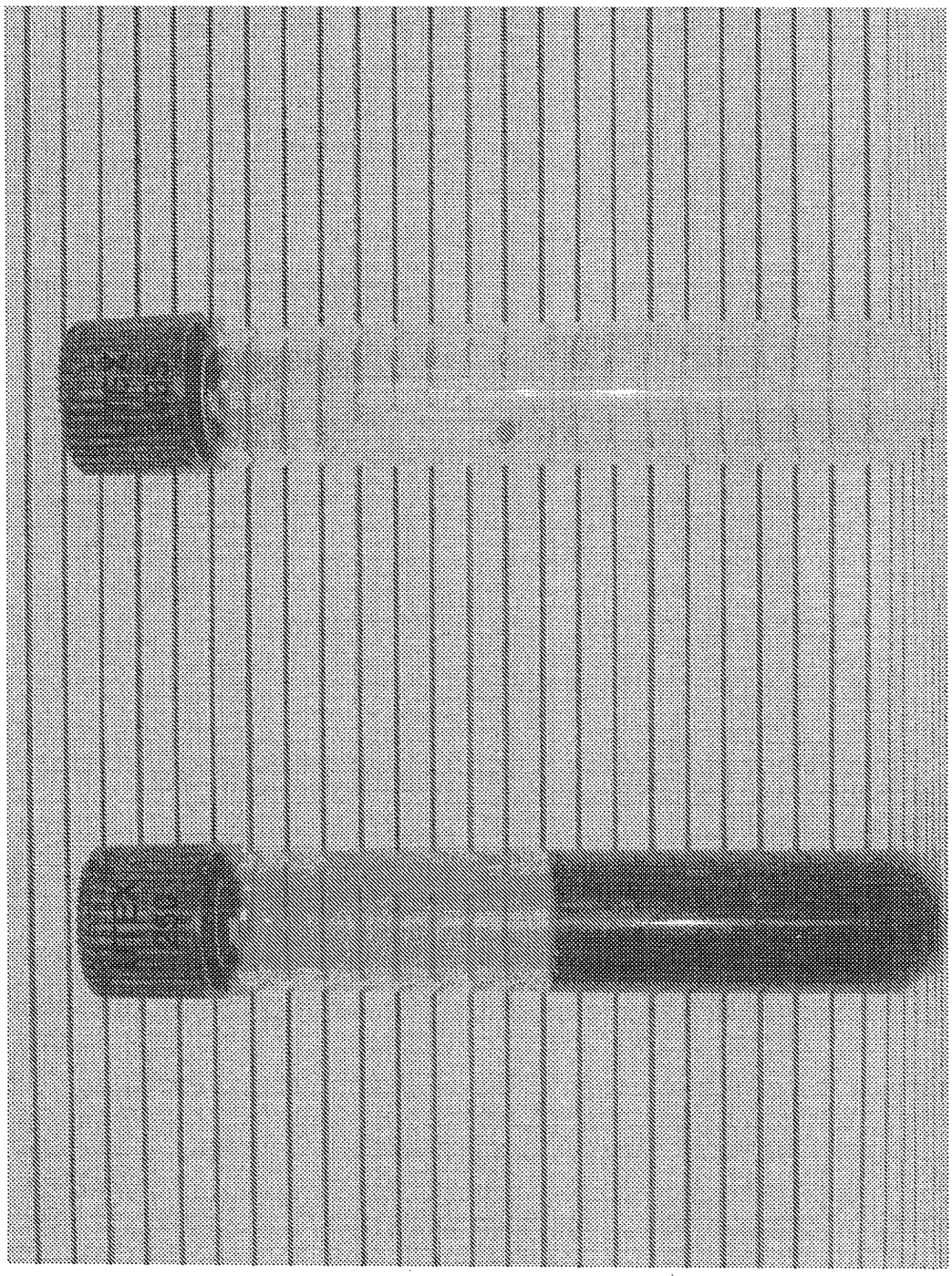


Figura 19

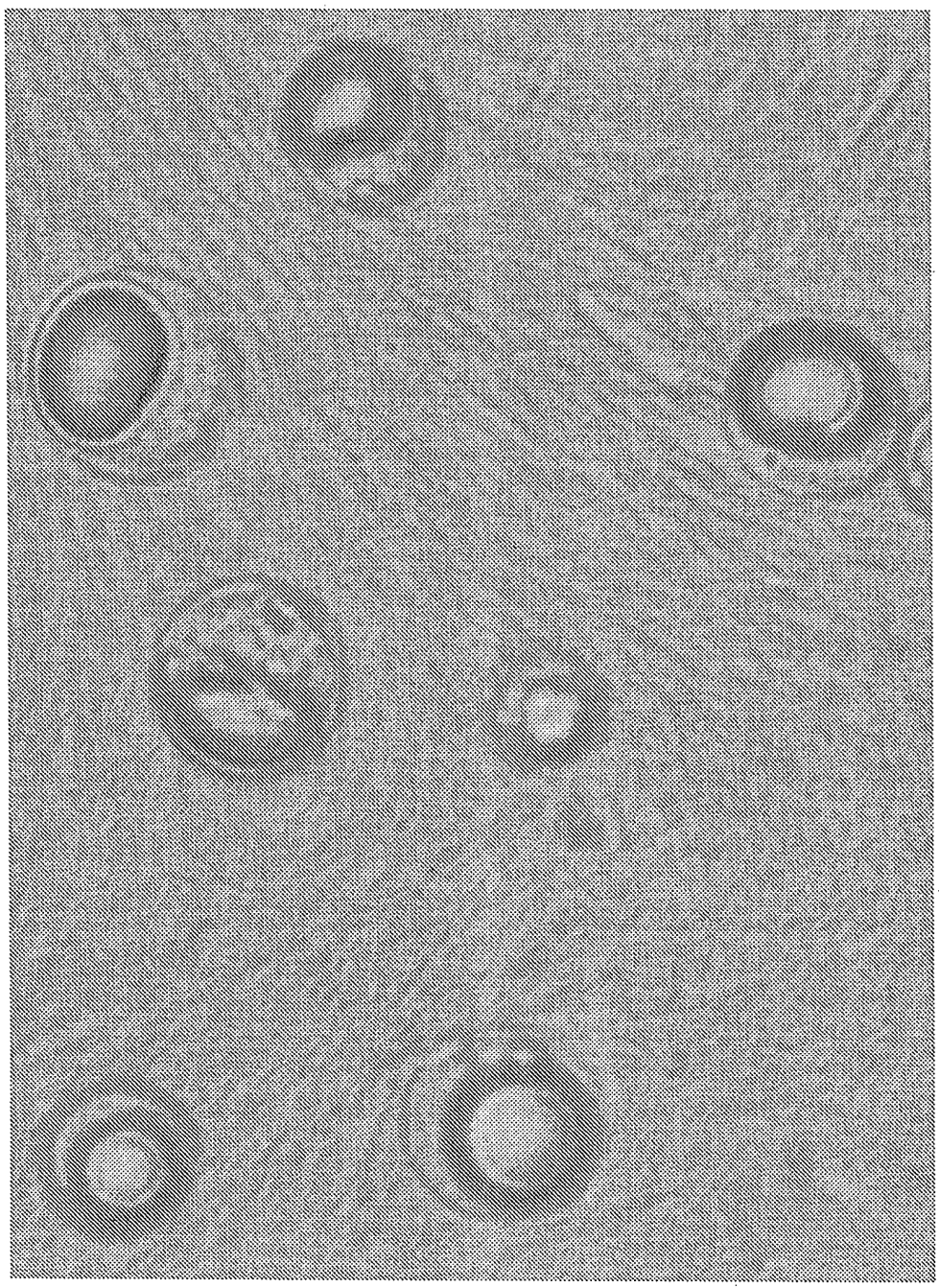


Figura 20

Figura 21a

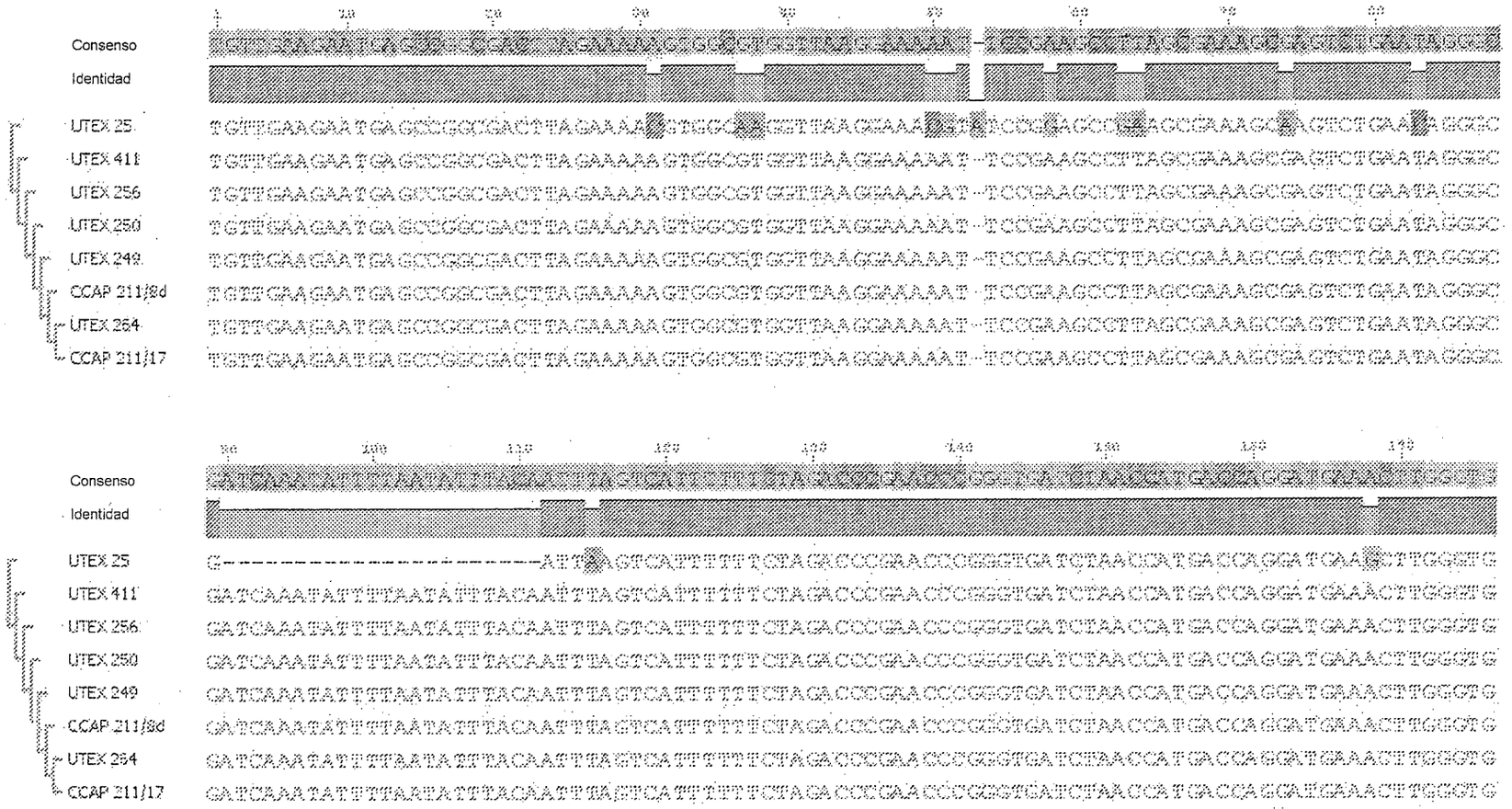
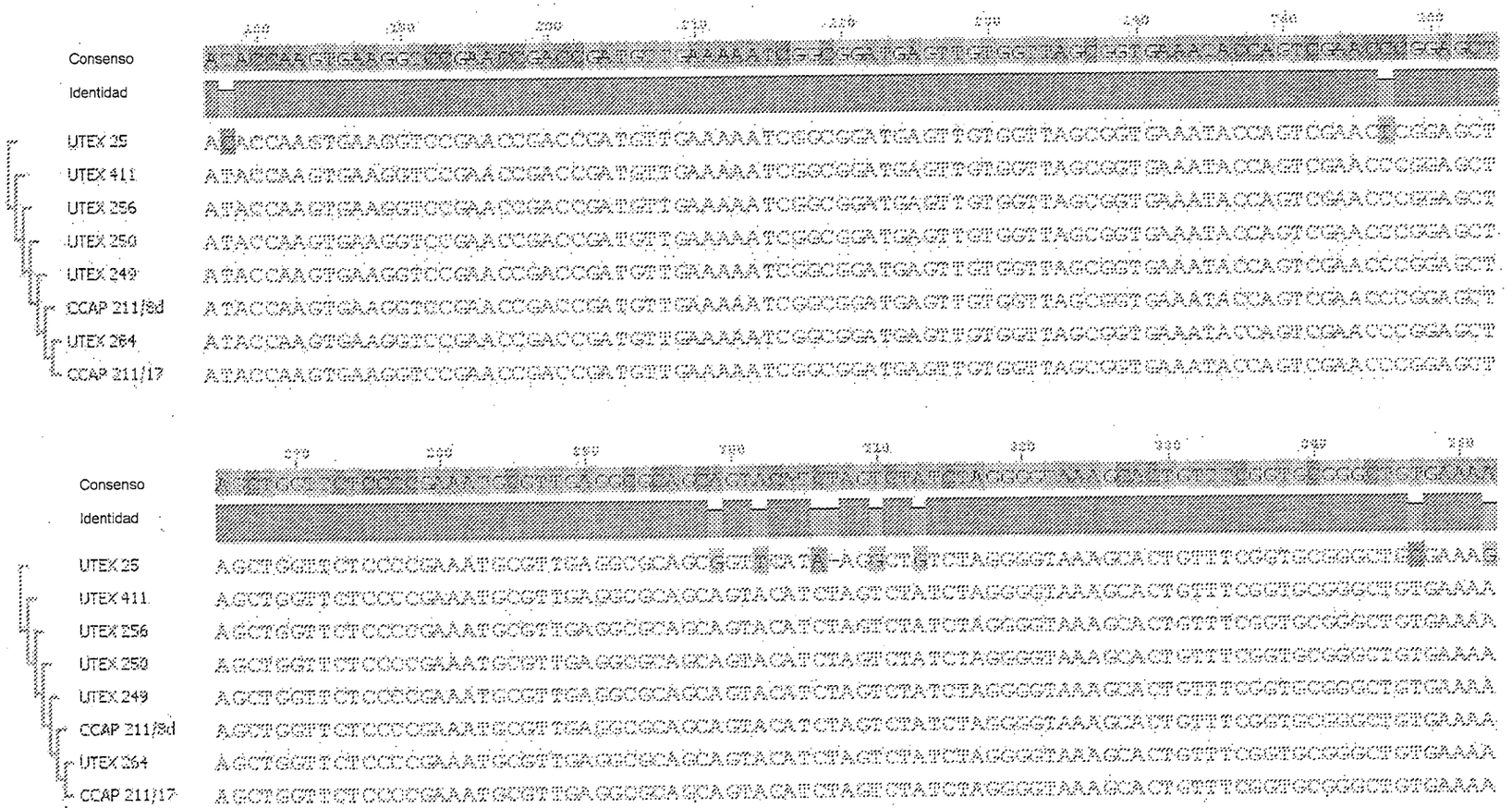

Consenso
Identidad
UTEX 25
UTEX 411
UTEX 256
UTEX 250
UTEX 249
CCAP 211/8d
UTEX 264
CCAP 211/17

Figura 21b


Consenso
Identidad
UTEX 25
UTEX 411
UTEX 256
UTEX 250
UTEX 249
CCAP 211/8d
UTEX 264
CCAP 211/17
Consenso
Identidad
UTEX 25
UTEX 411
UTEX 256
UTEX 250
UTEX 249
CCAP 211/8d
UTEX 264
CCAP 211/17

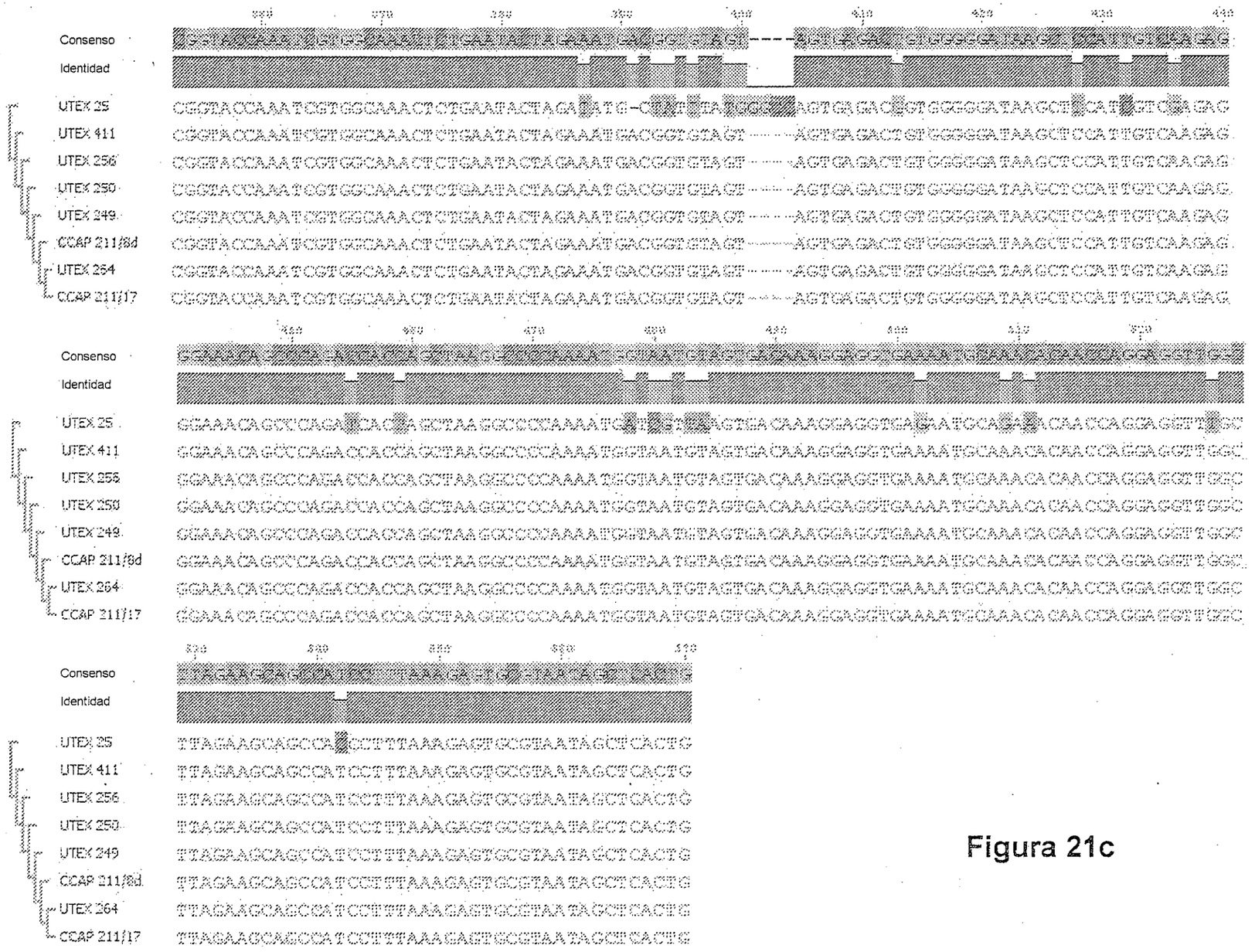
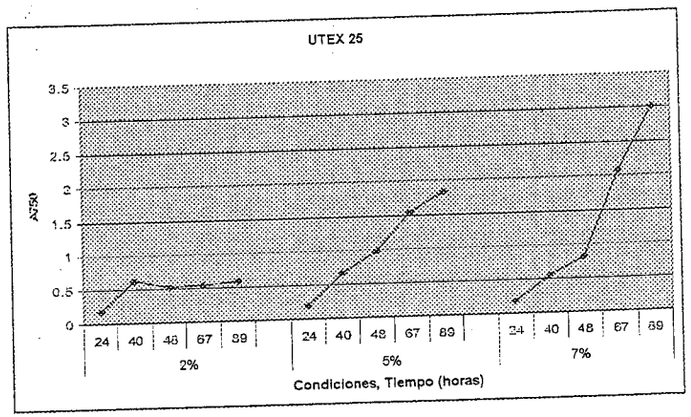
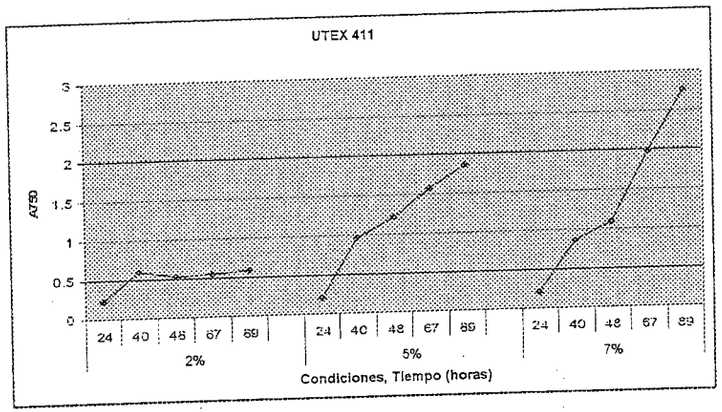
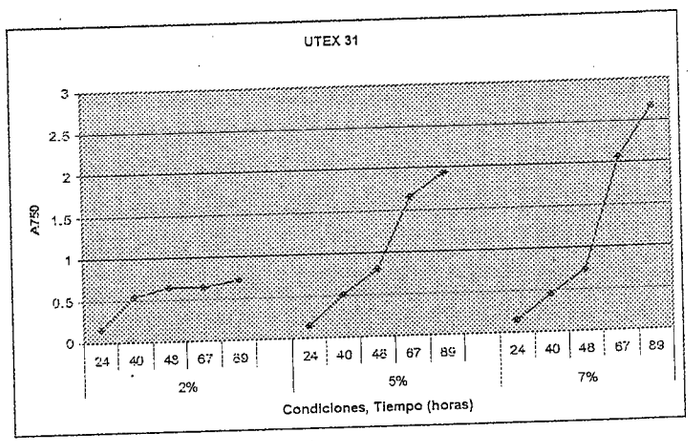

Consenso
Identidad
UTEX 25
UTEX 411
UTEX 256
UTEX 250
UTEX 249
CCAP 211/8d
UTEX 264
CCAP 211/17

Figura 21c

Figura 22


UTEX 25
A750
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24 40 48 67 89 24 40 48 67 89 24 40 48 67 89
2%
5%
7%
Condiciones, Tiempo (horas)


UTEX 411
A750
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24 40 48 67 89 24 40 48 67 89 24 40 48 67 89
2%
5%
7%
Condiciones, Tiempo (horas)


UTEX 31
A750
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24 40 48 67 89 24 40 48 67 89 24 40 48 67 89
2%
5%
7%
Condiciones, Tiempo (horas)

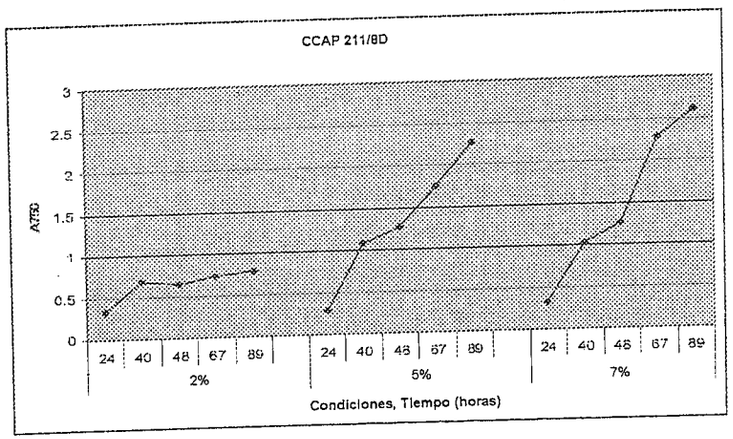

CCAP 211/8D
A750
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24 40 48 67 89 24 40 48 67 89 24 40 48 67 89
2%
5%
7%
Condiciones, Tiempo (horas)

Figura 23

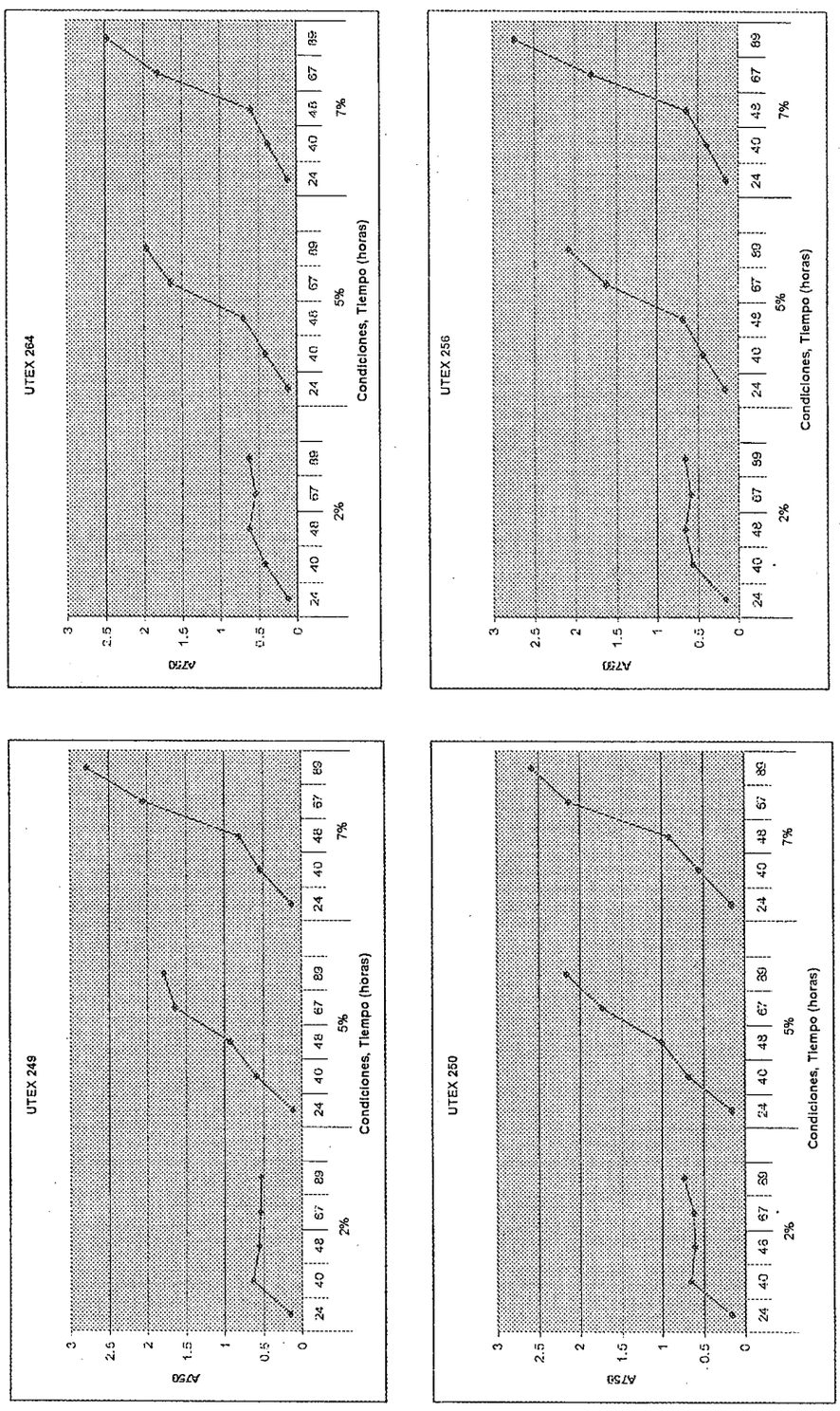
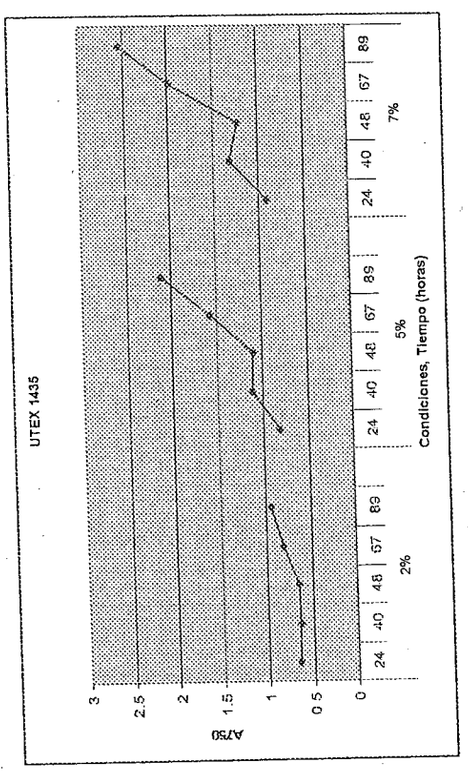
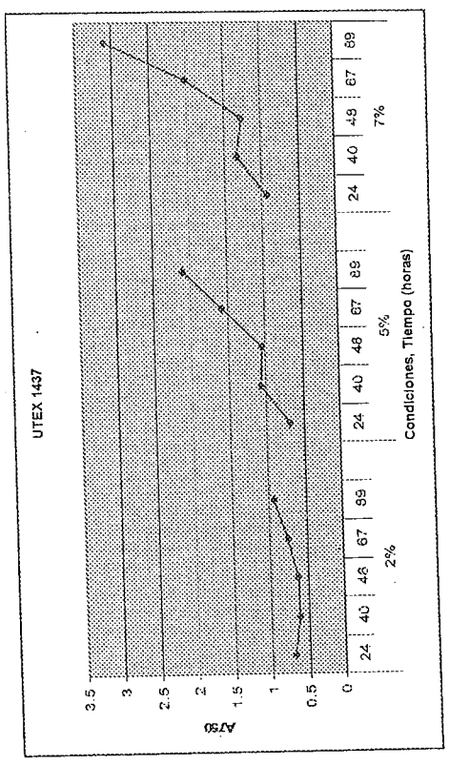
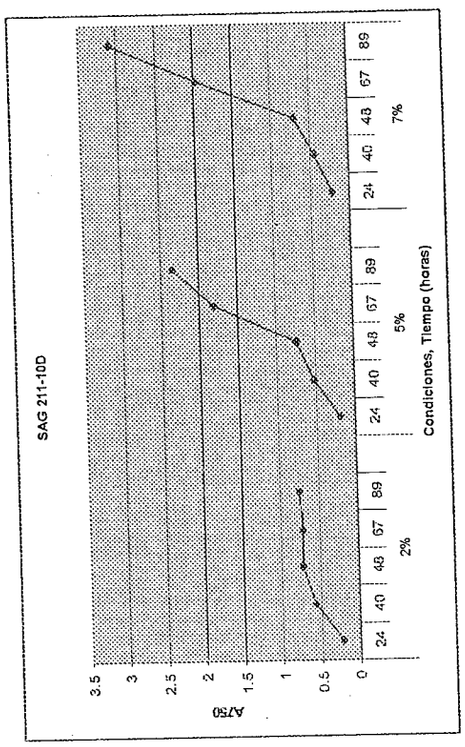

UTEX 264
UTEX 256
UTEX 249
UTEX 250
A750
A730
A758
Condiciones, Tiempo (horas)
2%
5%
7%
24
40
48
67
89

Figura 24


UTEX 1435
A750
Condiciones, Tiempo (horas)
2%
5%
7%


UTEX 1437
A750
Condiciones, Tiempo (horas)
2%
5%
7%


SAG 211-10D
A750
Condiciones, Tiempo (horas)
2%
5%
7%

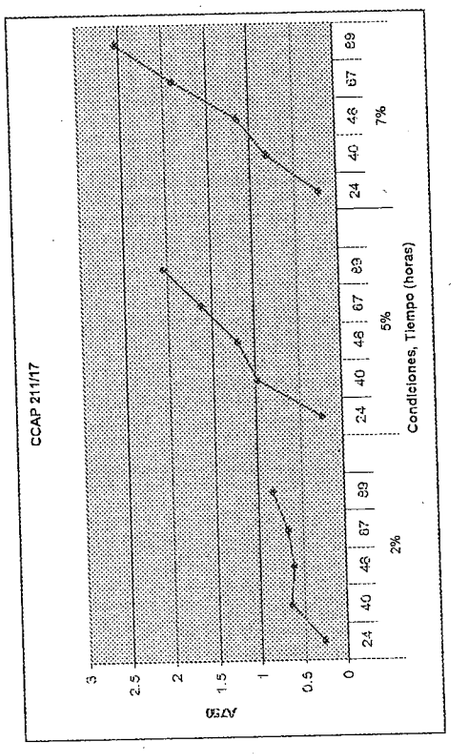

CCAP 211/17
A750
Condiciones, Tiempo (horas)
2%
5%
7%

Figura 25

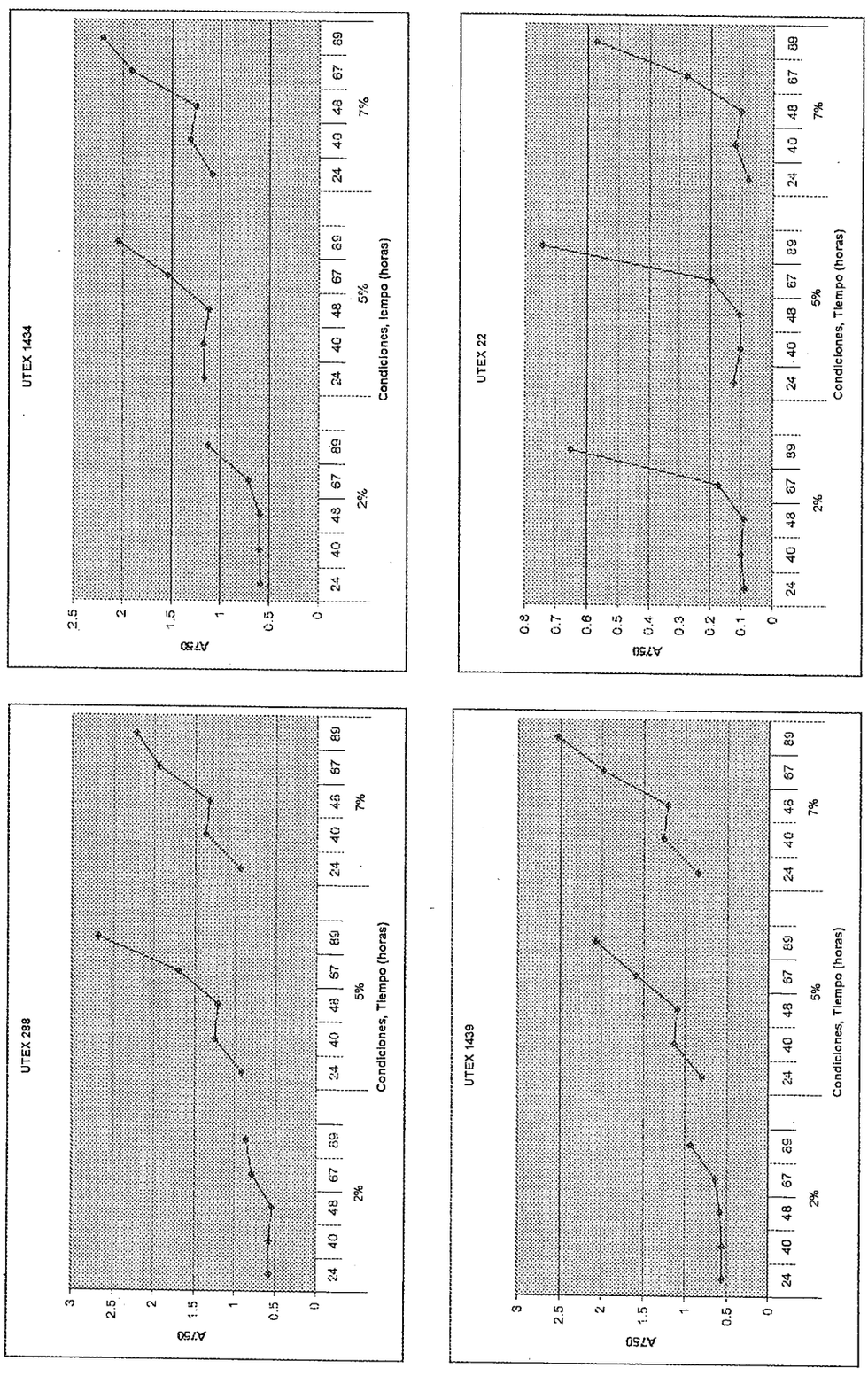
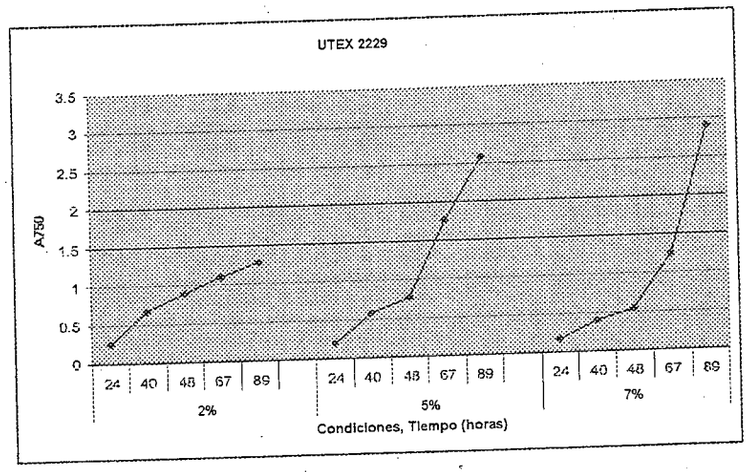
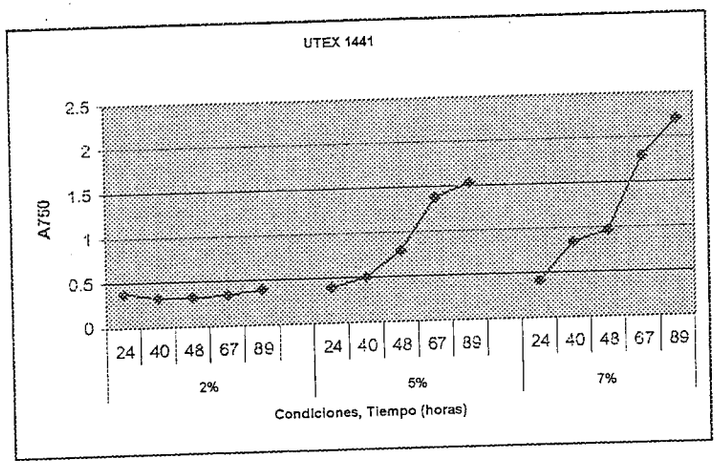
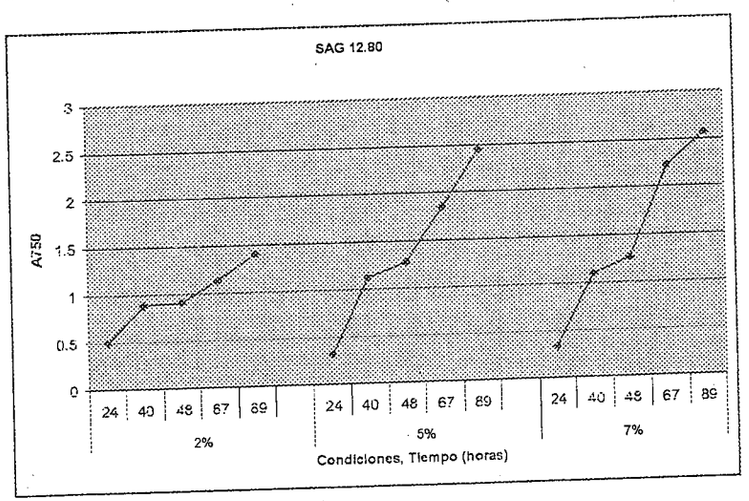

UTEX 288
UTEX 1434
UTEX 1439
UTEX 22
A750
Condiciones, Tiempo (horas)
2%
5%
7%

Figura 26


UTEX 2229
A750
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24 40 48 67 89
24 40 48 67 89
24 40 48 67 89
2%
5%
7%
Condiciones, Tiempo (horas)


UTEX 1441
A750
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24 40 48 67 89
24 40 48 67 89
24 40 48 67 89
2%
5%
7%
Condiciones, Tiempo (horas)


SAG 12.80
A750
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24 40 48 67 89
24 40 48 67 89
24 40 48 67 89
2%
5%
7%
Condiciones, Tiempo (horas)

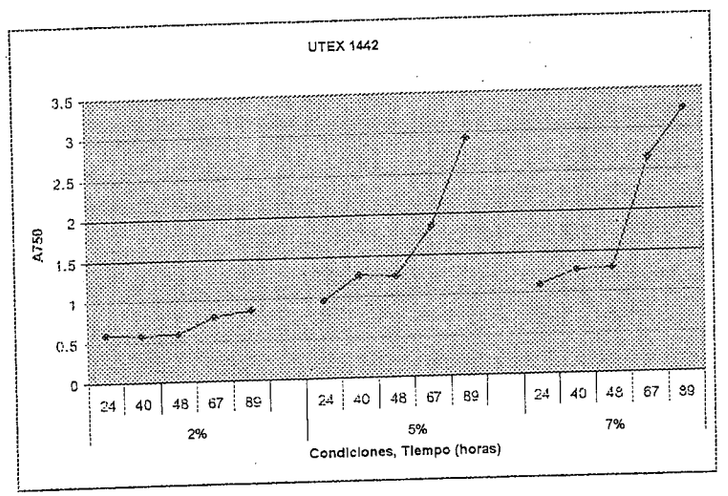

UTEX 1442
A750
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24 40 48 67 89
24 40 48 67 89
24 40 48 67 89
2%
5%
7%
Condiciones, Tiempo (horas)

Figura 27

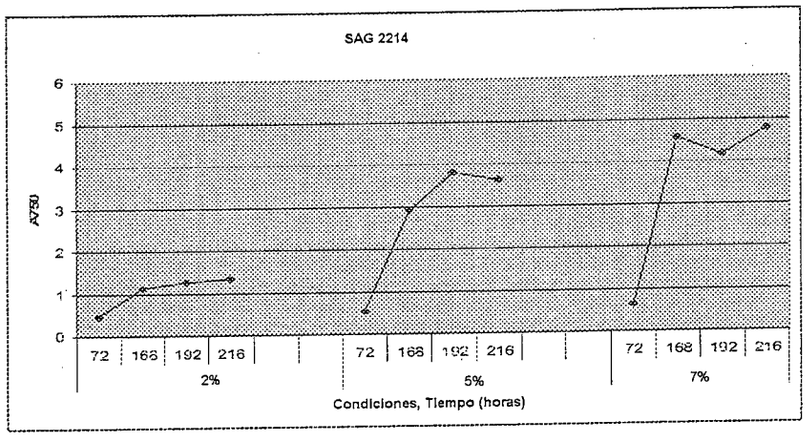


Figura 28

Diversidad de cadenas de lípidos en especies de microalgas

No. de cepa de la Tabla 8	C:14:0	C:16:0	C:16:1	C:18:0	C:18:1	C:18:2	C:18:3	C:20:0	C:20:1
1	0.57	10.30	0	3.77	70.52	14.24	1.45	0.27	0
2	0.61	8.70	0.30	2.42	71.98	14.21	1.15	0.20	0.24
4	0.68	9.82	0	2.83	65.78	12.94	1.46	0	0
5	1.47	21.96	0	4.35	22.64	9.58	5.2	3.88	3.3
10	0	12.01	0	0	50.33	17.14	0	0	0
11	1.41	29.44	0.70	3.05	57.72	12.37	0.97	0.33	0
12	1.09	25.77	0	2.75	54.01	11.90	2.44	0	0

Figura 29a

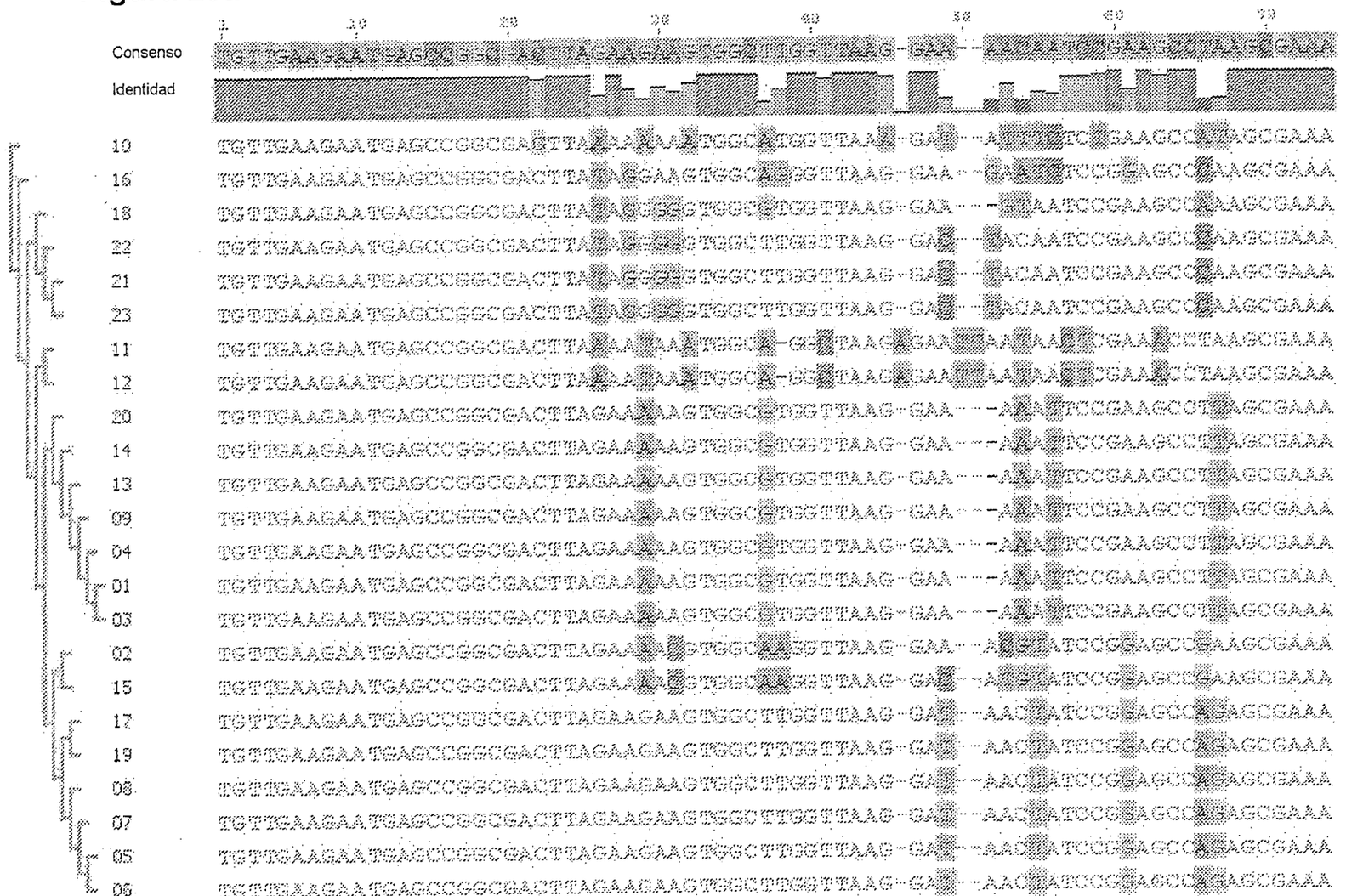

Consenso
Identidad
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figura 29b

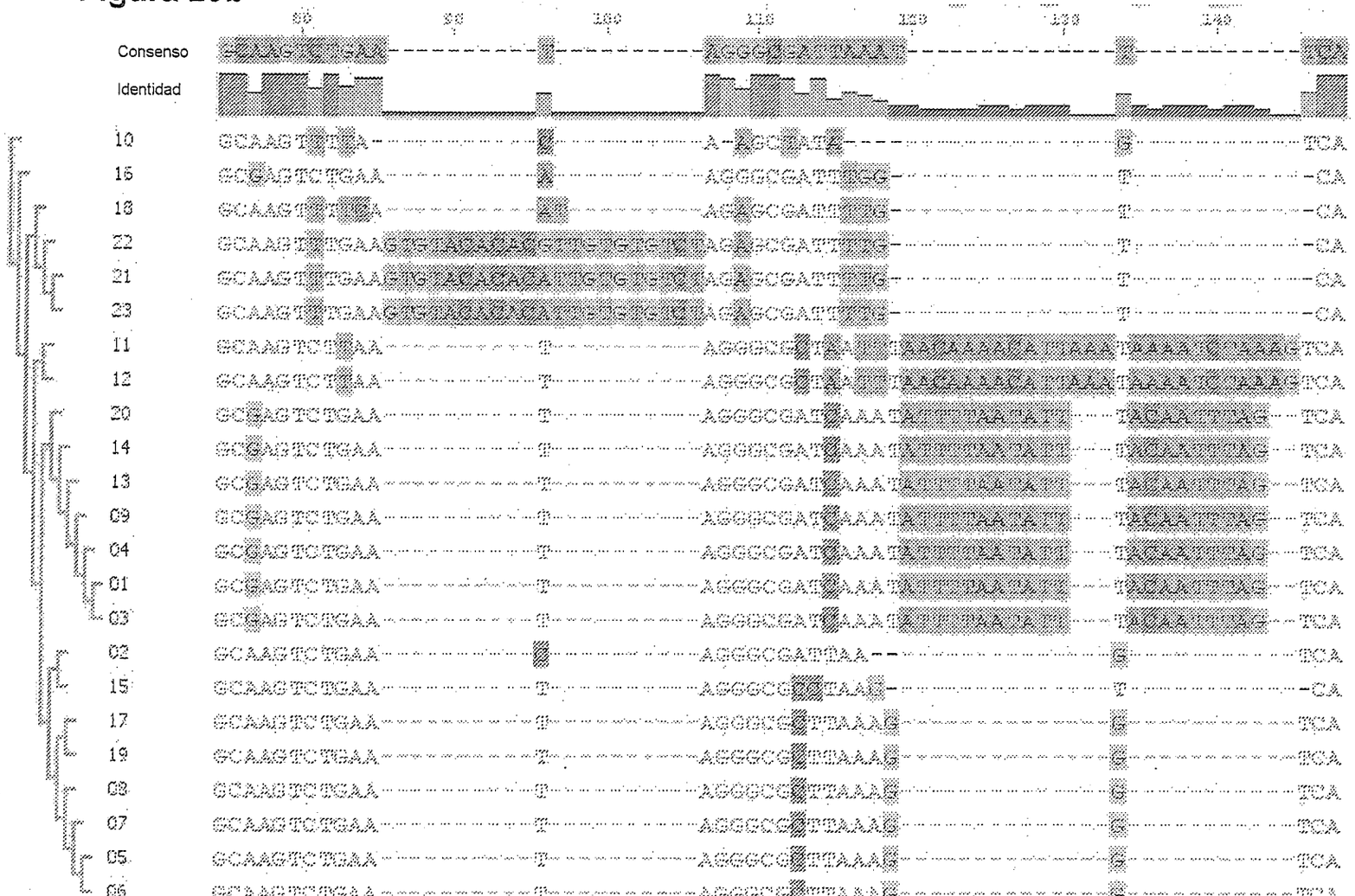

Consenso
Identidad
10
15
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figura 29c

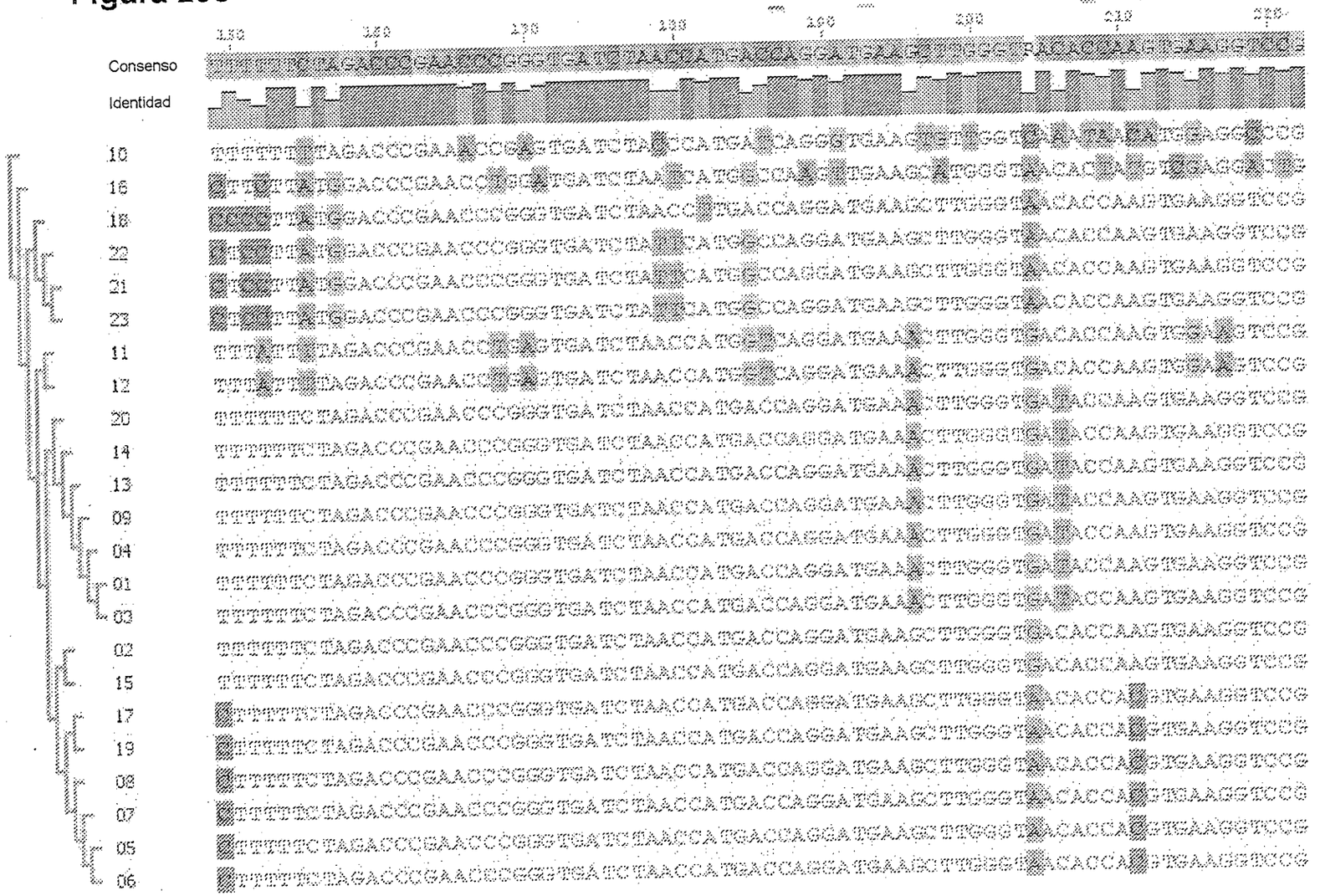

Consenso
Identidad
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figura 29d

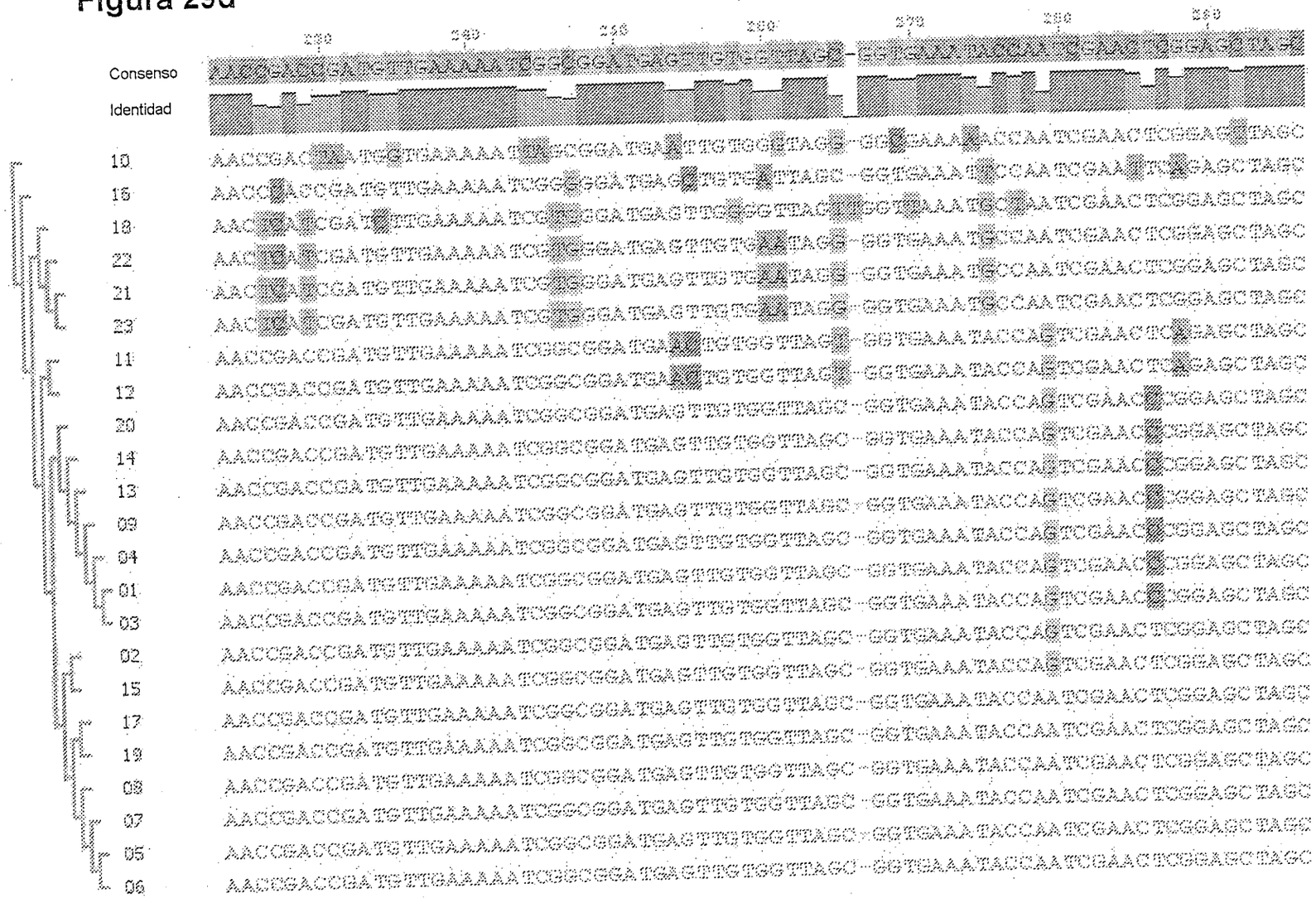

Consenso
Identidad
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figura 29e

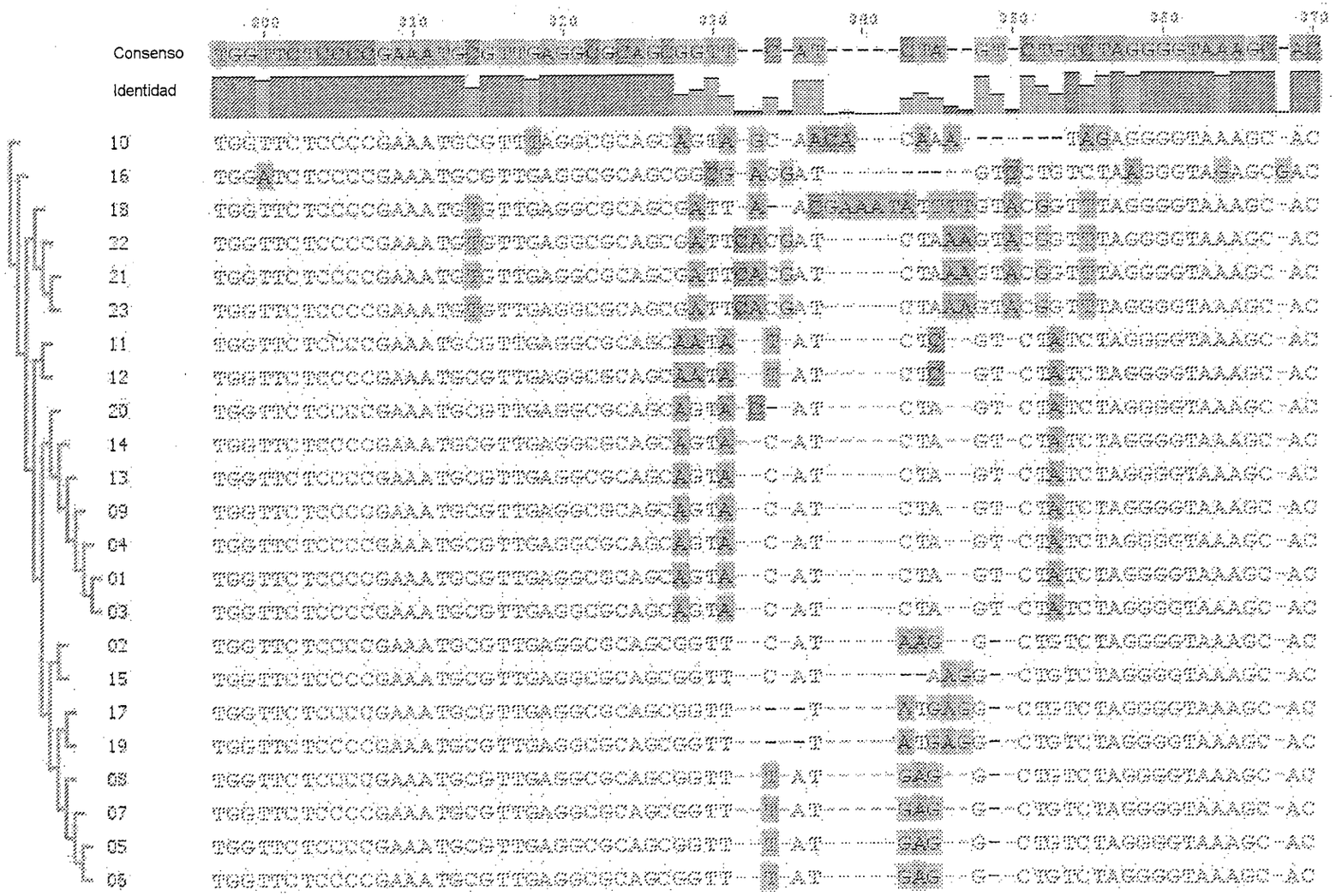

Consenso
Identidad
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figura 29f


Consenso
Identidad
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figura 29g

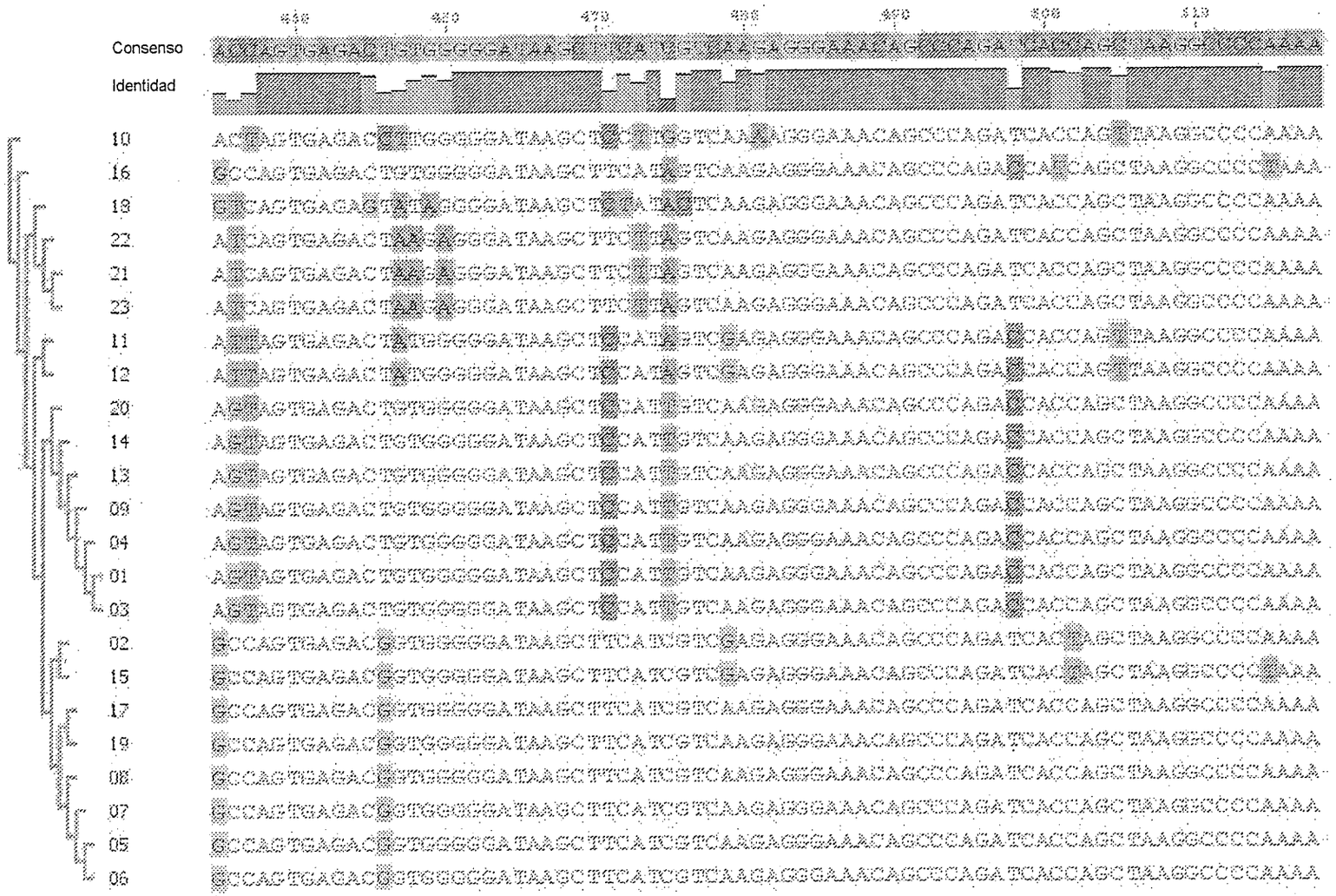

Consenso
Identidad
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figura 29h

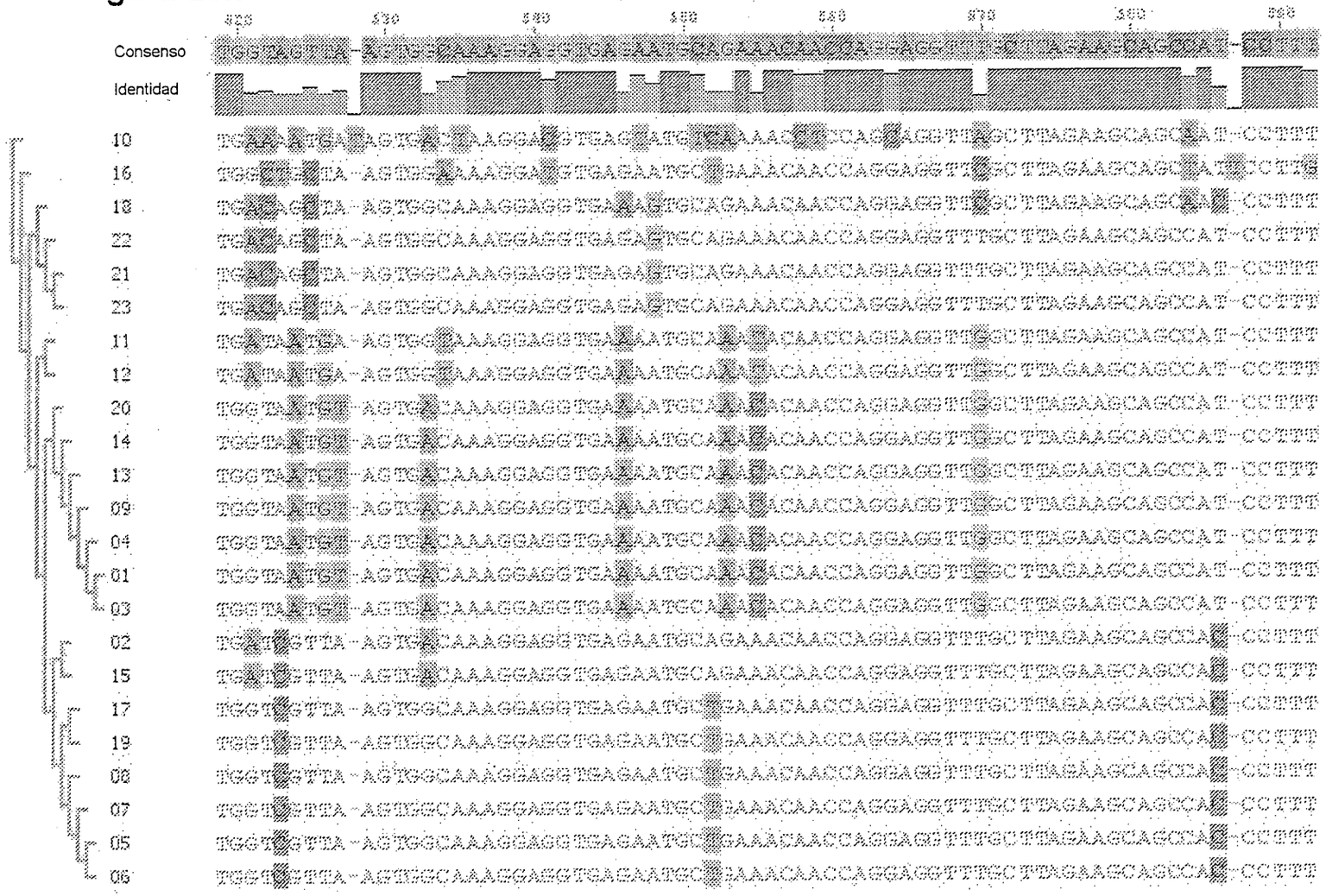
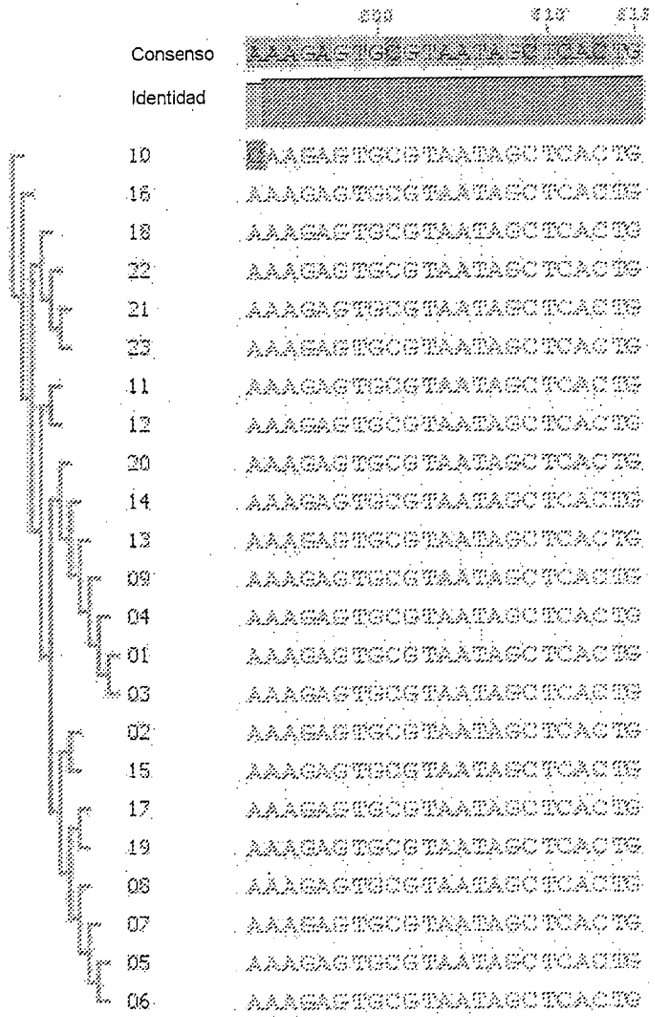

Consenso
Identidad
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

Figura 29i


Consenso
Identidad
10
16
18
22
21
23
11
12
20
14
13
09
04
01
03
02
15
17
19
08
07
05
06

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-134253- -00000-0000

Fecha: 2010-10-28 18:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 306

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
SOLAZYME, INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 134253
	Solicitud internacional	PCT/US2009/040123
	Fecha inicio fase nacional	09/11/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2 1 5 7 8 8

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 03 DIC. 2010.
adpa11