República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0811967-8 A2

(22) Data do Depósito: 02/06/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 11/12/2008

(54) Título: PRODUÇÃO DE ÓLEO NOS MICRO-ORGANISMOS

(51) Int. Cl.: C12P 7/64; C12N 1/00.

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2007 US 60/941,581; 10/07/2007 US 60/959,174; 27/08/2007 US 60/968,291; 28/01/2008 US 61/024,069.

(71) Depositante(es): SOLAZYME, INC..

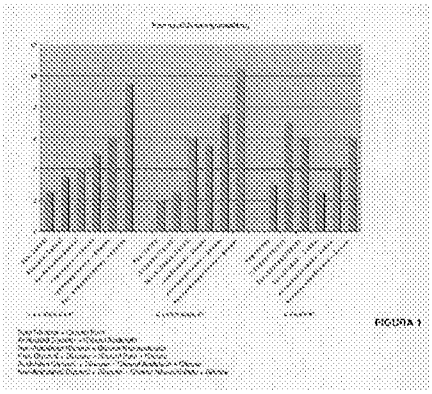
(72) Inventor(es): DONALD E. TRIMBUR; CHUNG-SOON IM; HARRISON F. DILLON; ANTHONY G. DAY; SCOTT FRANKLIN; ANNA CORAGLIOTTI.

(86) Pedido PCT: PCT US2008065563 de 02/06/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/151149 de 11/12/2008

(85) Data da Fase Nacional: 30/11/2009

(57) Resumo: PRODUÇÃO DE ÓLEO EM MICROORGANISMOS A invenção fornece método e composição útil para a produção de óleo, combustíveis, óleos químicos e outros compostos em microorganismos. Em particular, a invenção fornece microorganismos oleaginosos e método de cultivo de baixo custo destes microorganismos. A invenção também fornece células microbianas contendo genes exógenos de codificação, por exemplo, uma lipase, transportador de sacarose, invertase sacarose, frutoquinase, um polissacarídeoenzima degradante, acil-graxo tioesterase ACP redutase acii-CoA/aldeído graxo, acii-CoA graxo redutase, aldeído redutase graxo, decarbonilase aldeído graxo e/ou uma proteína transportadora de acil. A invenção também inclui o método de fabricação de combustíveis de transporte, tais como diesel renovável, biodiesel e combustível de aviação renováveis.



PRODUÇÃO DE ÓLEO EM MICROORGANISMOS

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta divulgação diz respeito à produção de óleos, combustíveis e óleos químicos fabricados a partir de microorganismos. Em particular, a divulgação se relaciona com microorganismos oleaginosos, incluindo microalgas, leveduras e fungos, e com os métodos de cultivo de tais microorganismos para a produção de compostos úteis, incluindo os lipídeos, ésteres de ácidos graxos, ácidos graxos, aldeídos, álcoois e alcanos, para utilização na indústria ou como uma fonte de energia ou de alimentos. Os microorganismos da invenção podem ser selecionados ou geneticamente modificados para uso nos métodos ou outros aspectos da invenção aqui descrita.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Combustível fóssil é um termo genérico para depósitos geológicos de combustíveis enterrados de materiais orgânicos, formados a partir de plantas e animais decompostos que foram convertidos em óleo cru, carvão , gás natural ou óleos pesados por exposição ao calor e à pressão na crosta terrestre ao longo de centenas de milhões de anos.

No diálogo comum, o combustível fóssil, também conhecido como combustível mineral, é utilizado como sinônimo de outros recursos naturais contendo hidrocarbonetos, como carvão, petróleo e gás natural. A utilização de combustíveis fósseis tem permitido o desenvolvimento industrial em grande escala e em grande parte suplantado os moinhos de água, bem como a combustão de madeira ou de turfa para aquecimento. Os combustíveis fósseis são recursos não-renováveis finitos.

Na geração de electricidade, a energia da combustão de combustíveis fósseis é muitas vezes usada para alimentar uma turbina. As gerações mais antigas muitas vezes usavam vapor gerado pela queima do combustível para girar a turbina mas, em novas plantas de energia, os gases produzidos pela queima do combustível gira uma turbina a gás diretamente. Com a modernização global nos séculos 20 e 21, a sede de energia proveniente de combustíveis fósseis, especialmente a gasolina derivada do petróleo, é uma das causas dos grandes conflitos regionais e globais.

A queima de combustíveis fósseis por seres humanos é a maior fonte de emissões de dióxido de carbono, um dos gases geradores do efeito estufa, permitindo o forçamento radiativo e contribuindo para o aquecimento global. Nos Estados Unidos, mais de 90% das emissões de gases de efeito estufa são provenientes da queima de combustíveis fósseis. Além disso, outros poluentes atmosféricos, como óxidos de nitrogénio, dióxido de enxofre, compostos orgânicos voláteis (COV) e metais pesados são produzidos.

A atividade humana aumenta os níveis de gases de efeito estufa, principalmente pela liberação de dióxido de carbono proveniente da queima de combustíveis fósseis, mas

outros gases, como o metano, não são negligenciáveis. As concentrações de muitos dos gases de efeito estufa têm aumentado ao longo do tempo devido às atividades humanas, como a queima de combustíveis fósseis e o desmatamento, levando a altas concentrações de dióxido de carbono. Segundo a hipótese do aquecimento global, gases de efeito estufa provenientes da indústria e da agricultura têm desempenhado um papel importante no aquecimento global observado recentemente.

A demanda por energia aumentada pela economia global também tem colocado uma pressão crescente sobre os custos dos hidrocarbonetos. Além de energia, muitas indústrias, incluindo os fabricantes de plástico e de produtos químicos, dependem muito da disponibilidade dos hidrocarbonetos como matéria-prima para seus processos de fabricação. Alternativas economicamente viáveis para as atuais fontes de abastecimento poderão ajudar a reduzir a pressão ascendente sobre a energia e os custos das matérias-primas.

RESUMO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a presente invenção é direcionada para a invenção que fornece um micróbio que, em várias modalidades, pode incluir uma célula de microalgas, uma levedura oleaginosa, ou um fungo que contém um gene que exógeno que codifica uma proteína selecionada do grupo constituído por uma lipase, um transportador de sacarose, sacarose invertase, frutoquinase, enzima degradante de polissacarídeos, uma tioesterase de acil-ACP graxo, um acyl-CoA graxo/aldeído redutase, uma redutase de acil-CoA graxo, um aldeído redutase graxo, um aldeído decarbonilase graxo, e uma proteína transportadora de acila (ACP). O micróbio (por exemplo, células de microalgas) pode, por exemplo, ser selecionado da Tabela 1. Em modalidades específicas, a célula é uma espécie do gênero *Chlorella*, como, por exemplo, *Chlorella fusca, Chlorella protothecoides, Clorela pyrenoidosa, Chlorella kessleri, Chlorella vulgaris,Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana* ou *Chlorella ellipsoidea*. Em outras modalidades, o micróbio é uma levedura oleaginosa selecionada do grupo consistindo de Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis, e Yarrowia lipolítica. Ainda em outras modalidades, o micróbio é um fungo selecionado do grupo que consiste em uma espécie do gênero *Mortierella, Mortierrla vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Penicillium lilacinum* , uma espécie do gênero *Hensenula*, uma espécie do gênero *Chaetomium*, uma espécie do gênero *Cladosporium*, uma espécie do gênero *Malbranchea*, uma espécie do gênero *Rhizopus*, e uma espécie do gênero *Pythium*. Em outras modalidades, a invenção inclui a expressão de enzimas de modificação de hidrocarbonetos em hospedeiros bacterianos, como *E. Coli* e

Bacill, um método de produção de diesel renovável. Em uma modalidade, o método compreende (a) cultivar uma população de microorganismos na presença de uma fonte de carbono fixo, no qual (i) os microorganismos acumulam pelo menos 10% do seu peso celular seco como lipídios, e (ii) a fonte de carbono fixo é selecionada do grupo que consiste de glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarose, melaço, glicose, arabinose, galactose, xilose, frutose, arabinose, manose, acetato, e qualquer combinação dos anteriores, (b) isolar componentes lipídicos da cultura de microorganismos, e (c) submeter os componentes lipídicos isolados a uma ou mais reações químicas para gerar alcanos de cadeia linear pelos quais o diesel renovável é produzido.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a uma composição de hidrocarbonetos líquidos feitos de acordo com o método descrito acima, onde a composição está de acordo com as especificações da norma ASTM D975.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de produzir combustível de jatos. Em uma modalidade, o método compreende (a) cultivar uma população de microorganismos na presença de uma fonte de carbono fixo, no qual (i) os microorganismos acumulam pelo menos 10% do seu peso celular seco como lipídios, e (ii) a fonte de carbono fixo é selecionada do grupo que consiste de glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarose, glicose, arabinose, galactose, xilose, frutose, arabinose, manose, acetato, e qualquer combinação dos anteriores, (b) isolar componentes lipídicos da cultura de microrganismos, (c) submeter os componentes lipídicos isolados a uma ou mais reações químicas para gerar alcanos de cadeia linear, (d) quebrar os alcanos de cadeia linear pelos quais o combustível de jato é produzido.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a uma composição de hidrocarbonetos líquidos produzidos de acordo com o método descrito acima, onde a composição está de acordo com as especificações da norma ASTM D1655.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a uma célula de levedura ou de microalga que tenha sido geneticamente modificada e/ou selecionada para expressar uma enzima de caminho lipídico em um nível alterado em relação a uma célula de tipo selvagem da mesma espécie. Em alguns casos, a célula produz mais lipídeos em comparação com a célula de tipo selvagem quando ambas as células são cultivadas nas mesmas condições. Em alguns casos, a célula foi geneticamente modificada e/ou selecionada para expressar uma enzima de via lipídica em um nível mais elevado do que as células de tipo selvagem. Em alguns casos, a enzima de via lipídica é selecionada do grupo consistindo de piruvato desidrogenase, acetil-CoA carboxilase, proteína transportadora de acila, e glicerol-3 fosfato aciltransferase. Em alguns casos, a célula foi geneticamente modificada e/ou selecionada para expressar uma enzima de via lipídica em um nível

inferior ao da célula de tipo selvagem. Em pelo menos uma modalidade na qual a célula expressa a enzima de via lipídica em um nível inferior, a enzima de via lipídica compreende citrato sintase.

Em algumas modalidades, as microalgas ou células de levedura acima descritas foram geneticamente modificadas e/ou selecionadas para expressar um regulador global da síntese de ácidos graxos, em um nível alterado em relação à célula de tipo selvagem, pelo qual os níveis de expressão de uma pluralidade de genes sintéticos de ácidos graxos são alterados em relação à célula de tipo selvagem. Em alguns casos, a enzima de via lipídica compreende uma enzima que modifica um ácido graxo. Em alguns casos, a enzima de via lipídica é selecionada de um estearoil-ACP desaturase e de um glicerolipídeo desaturase.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um micróbio produtor de óleo contendo um ou mais genes exógenos, onde os genes exógenos codificam proteína(s) selecionada(s) do grupo constituído por uma tioesterase de acil-ACP graxo, uma redutase de acil-CoA graxo, um aldeído redutase graxo, um acyl-CoA graxo/aldeído redutase, um aldeído decarbonilase graxo, e uma proteína transportadora de acila. Em alguns casos, o micróbio é *Chlorella protothecoides, Clorela minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea,* ou *Chlorella sp.* Em outros casos, o micróbio é outra espécie, como aqui descrito. Em uma modalidade, o gene exógeno está em ligação operável com um promotor, que é induzível ou repressível em resposta a um estímulo. Em alguns casos, o estímulo é selecionado do grupo constituído por uma pequena molécula produzida exogenamente, calor, frio e luz. Em alguns casos, o gene exógeno é expressado em um compartimento celular. Em algumas modalidades, o compartimento celular é selecionado do grupo consistindo de um cloroplasto e de uma mitocôndria.

Em uma modalidade, o gene exógeno codifica uma tioesterase de acil-ACP de ácidos graxos. Em alguns casos, a tioesterase codificada pelo gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos a partir de uma proteína transportadora de acila (ACP). Em alguns casos, a tioesterase codificada pelo gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 10 a 14 carbonos de uma ACP. Em uma modalidade, o tioesterase codificada pelo gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 12 carbonos de uma ACP.

Em uma modalidade, o gene exógeno codifica um acil-CoA graxo/aldeído redutase. Em alguns casos, a redutase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 20 a 30 carbonos em um álcool primário correspondente. Em alguns casos, a redutase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 8 a 18 carbono em um álcool primário correspondente. Em alguns casos, a redutase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 10 a 14 carbono em um

álcool primário correspondente. Em uma modalidade, a redutase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 12 carbonos em dodecanol.

Em uma modalidade, o gene exógeno codifica um acil-CoA redutase graxo. Em alguns casos, a redutase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 8 a 18 carbonos em um aldeído correspondente. Em uma modalidade, a redutase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 12 carbonos em dodecanal.

Em pelo menos uma modalidade, o micróbio da invenção contém ainda um ou mais genes de utilização de sacarose exógenos.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um micróbio contendo dois genes exógenos, onde o primeiro gen exógeno codifica tioesterase de acil-ACP graxo e o segundo gen exógeno codifica uma proteína selecionada de um grupo consistindo de uma redutase de acil-CoA graxo, um acyl-CoA graxo/aldeído redutase, e uma proteína transportadora de acila. Em alguns casos, o micróbio é *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella spou Chlorella protothecoides. Em outros casos, o micróbio é outra espécie, como aqui descrito. Em alguns casos, cada um dos dois genes exógenos está em ligação operacional com um promotor, que é induzível em resposta a um estímulo. Em alguns casos, cada promotor é induzível em resposta a um estímulo idêntico.*

Em uma modalidade, a tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos de uma ACP.

Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica um acil-CoA graxo/aldeído redutase, que cataliza a redução de um acil-CoA graxo de 8 a 18 carbonos em um álcool primário correspondente. Em alguns casos, a tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 10 a 14 carbonos de um ACP, e a redutase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 10 a 14 carbonos no álcool primário correspondente, onde a tioesterase e a redutase atuam no mesmo comprimento de cadeia de carbono. Em uma modalidade, a tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 12 carbonos de um ACP, e a redutase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 12 carbonos em dodecanol. Em alguns casos, a redutase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 8 a 18 carbonos em um aldeído correspondente.

Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica um acil-CoA redutase graxo, e o micróbio ainda contém um terceiro gene exógeno que codifica um aldeído decarbonilase graxo. Em alguns casos, o tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno

catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos em uma ACP, a redutase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 8 a 18 carbonos em um aldeído graxo correspondente, e a decarbonilase codificada pelo terceiro gene exógeno catalisa a conversão de um aldeído graxo de 8 a 18 carbonos em um alcano correspondente, onde a tioesterase, a redutase e a decarbonilase atuam no mesmo comprimento de cadeia de carbono.

Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica uma proteína transportadora de acila que é naturalmente co-expressada com a tioesterase de acil-ACP graxo.

Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica uma proteína transportadora de acila, e o micróbio contém ainda um terceiro gene exógeno que codifica uma proteína selecionada do grupo constituído por uma redutase de acil-CoA graxo e um acil-CoA graxo/aldeído redutase. Em alguns casos, o terceiro gene exógeno codifica uma redutase de acil-CoA graxo, e o micróbio ainda contém um quarto gene exógeno que codifica uma decarbonilase de aldeído graxo.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de produção de uma molécula em uma população de micróbios. Em uma modalidade, o método compreende o cultivo de uma população de micróbios em um meio de cultura, onde os micróbios contêm (i) um primeiro gene exógeno que codifica uma tioesterase de acil- ACP graxo, e (ii) um segundo gene exógeno que codifica um acil-CoA graxo/aldeído redutase, e os micróbios sintetizam um ácido graxo ligado a uma proteína transportadora de acila (ACP), a tioesterase de acil-ACP graxo catalisa a clivagem do ácido graxo da ACP para produzir, por meio de transformação, um acil-CoA graxo, e o acil-CoA graxo/aldeído redutase catalisa a redução do acil-CoA em um álcool.

Em uma modalidade do método de produção de uma molécula em uma população do micróbio, o micróbio é *Clorela minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Clorela ellipsoidea, Chlorella sp.* ou *Chlorella protothecoides*. Em outros casos, o micróbio é outra espécie de microorganismo, como aqui descrito. Em alguns casos, o meio de cultura contém glicerol. Em uma modalidade, o glicerol é um subproduto de um processo de transesterificação. Em alguns casos, o meio de cultura contém glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixo. Em uma modalidade, a pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é sacarose. Em alguns casos, todo o glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa são fornecidos para os micróbios no início da fermentação. Em alguns casos, o glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa são alimentados aos micróbios em uma taxa predeterminada ao longo do curso da fermentação. Em alguns métodos de cultura da invenção, o glicerol é fornecido aos micróbios na ausência de pelo

menos uma outra fonte de carbono fixa por um primeiro período de tempo, pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é fornecida no final do primeiro período de tempo, e os micróbios são cultivados por um segundo período de tempo na presença de pelo menos um outra fonte de carbono fixa.

Em algumas modalidades, os genes exógenos estão em ligação operacional com um promotor que é induzível em resposta a um estímulo. Em alguns casos, o método inclui ainda fornecer o primeiro estímulo e incubar a população de micróbios por um primeiro período de tempo na presença do primeiro estímulo para produzir um álcool. Em alguns casos, o método compreende ainda a extração de álcool a partir da biomassa aquosa compreendendo o meio de cultura e os micróbios.

Em algumas modalidades, a tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos do ACP, e a redutase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 8 a 18 carbonos em um álcool primário correspondente, onde a tioesterase e a redutase atuam no mesmo comprimento de cadeia de carbono. Em alguns casos, a tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 10 a 14 carbonos do ACP, e a redutase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 10 a 14 carbonos em um álcool primário correspondente, onde a tioesterase e a redutase atuam no mesmo comprimento de cadeia de carbono. Em uma modalidade, a tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 12 carbonos do ACP, e a redutase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 12 carbonos em dodecanol. Em alguns casos, os micróbios ainda contêm um terceiro gene exógeno codificando uma proteína transportadora de acila. Em algumas modalidades, o terceiro gene exógeno codifica uma proteína transportadora de acila que é naturalmente co-expressada com a tioesterase de acil-ACP graxo.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de produção de uma molécula de lipídio em uma população de micróbios. Em uma modalidade, o método compreende o cultivo de uma população de micróbios em um meio de cultura, onde os micróbios contêm (i) um primeiro gene exógeno que codifica uma tioesterase de acil- ACP graxo, e (ii) um segundo gene exógeno que codifica uma redutase de acil-CoA graxo, e onde os micróbios sintetizam um ácido graxo ligado a uma proteína transportadora de acila (ACP), a tioesterase de acil-ACP graxo catalisa a clivagem do ácido graxo da ACP para produzir, por meio de transformação, um acil-CoA graxo, e a redutase de acil-CoA graxo catalisa a redução do acil-CoA em um aldeído. Em alguns casos, o micróbio é Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella

sp. ou Chlorella protothecoides. Em outros casos, o micróbio é outra espécie de microorganismo, como aqui descrito.

Em algumas modalidades, os genes exógenos estão em ligação operacional com um promotor que é induzível em resposta a um primeiro estímulo, e o método ainda compreende fornecer o primeiro estímulo e incubar a população de micróbios por um primeiro período de tempo na presença do primeiro estímulo para produzir um aldeído. Em uma modalidade, o método compreende ainda a extração de aldeídos a partir da biomassa aquosa compreendendo o meio de cultura e a população de micróbios.

Em algumas modalidades, a tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos da ACP, e a redutase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 8 a 18 carbonos em um aldeído correspondente, onde a tioesterase e a redutase atuam no mesmo comprimento de cadeia de carbono. Em alguns casos, os micróbios ainda contêm um terceiro gene exógeno que codifica um aldeído decarbonilase graxo que catalisa a conversão do aldeído em um alcano.

Em alguns casos, os genes exógenos estão em ligação operacional com um promotor que é induzível em resposta a um primeiro estímulo, e o método compreende ainda fornecer o primeiro estímulo, e incubar a população de micróbios por um primeiro período de tempo no presença do primeiro estímulo para produzir um alcano. Em alguns casos, o método compreende ainda a extração de alcanos a partir da biomassa aquosa compreendendo o meio de cultura e a população de micróbios.

Em alguns casos, o tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos da ACP, a redutase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de um acil-CoA graxo de 8 a 18 carbonos em um aldeído graxo correspondente, e a decarbonilase codificada pelo terceiro gene exógeno catalisa a conversão de um aldeído graxo de 8 a 18 carbonos em um alcano correspondente, onde a tioesterase, a redutase e a decarbonilase atuam no mesmo comprimento de cadeia de carbono.

Em algumas modalidades, os micróbios ainda contêm um terceiro gene exógeno codificando uma proteína transportadora de acila. Em alguns casos, o terceiro gene exógeno codifica uma proteína transportadora de acila que é naturalmente co-expressada com a tioesterase de acil-ACP graxo. Em alguns casos, os micróbios ainda contêm um quarto gene exógeno que codifica um aldeído decarbonilase graxo que catalisa a conversão do aldeído em um alcano.

Em alguns métodos, o meio de cultura contém glicerol. Em uma modalidade, o glicerol é um subproduto de um processo de transesterificação. Em alguns casos, o meio de

cultura contém glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixo. Em uma modalidade, a pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é sacarose. Em alguns casos, todo o glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa são fornecidos para os micróbios no início da fermentação. Em alguns casos, o glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa são alimentados aos micróbios em uma taxa predeterminada ao longo do curso da fermentação. Em uma modalidade, o glicerol é fornecido aos micróbios na ausência de pelo menos uma outra fonte de carbono fixa por um primeiro período de tempo, pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é fornecida no final do primeiro período de tempo, e os micróbios são cultivados por um segundo período de tempo na presença de pelo menos um outra fonte de carbono fixa.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de produção de uma molécula de ácido graxo com um comprimento de cadeia de carbono específico em uma população de micróbios. Em uma modalidade, o método compreende o cultivo de uma população de micróbios produtores de lipídios em meio de cultura em que os micróbios contêm um gene exógeno que codifica uma tioesterase de acil-ACP graxo com uma atividade específica para um comprimento de cadeia de carbono, e em que os micróbios sintetizam um ácido graxo ligado a uma proteína transportadora de acila (ACP), e a tioesterase catalisa a clivagem do ácido graxo da ACP quando o ácido graxo foi sintetizado para o comprimento da cadeia de carbono específico. Em alguns casos, o micróbio é Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp. ou Chlorella protothecoides. Em outros casos, o micróbio é outra espécie de microorganismo, como aqui descrito.

Em algumas modalidades, o gene exógeno está em ligação operacional com um promotor que é induzível em resposta a um primeiro estímulo, e o método ainda compreende fornecer o primeiro estímulo e incubar a população de micróbios por um período de tempo na presença do primeiro estímulo. Em alguns casos, o método compreende ainda a extração do ácido graxo a partir da biomassa aquosa compreendendo o meio de cultura e a população de micróbios.

Em alguns casos, os micróbios ainda contêm um segundo gene exógeno codificando uma proteína transportadora de acila. Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica uma proteína transportadora de acila que é naturalmente co-expressada com a tioesterase de acil-ACP graxo. Em uma modalidade, a tioesterase de acil-ACP catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos de uma ACP.

Em alguns casos, o meio de cultura contém glicerol. Em uma modalidade, o glicerol é um subproduto de um processo de transesterificação. Em algumas modalidades, o meio de cultura contém glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa. Em uma

modalidade, pelo menos uma outra fonte de carbono é sacarose. Em alguns casos, todo o glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa são fornecidos para os micróbios no início da fermentação. Em alguns casos, o glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa são alimentados aos micróbios em uma taxa predeterminada ao longo do curso da fermentação. Em uma modalidade, o glicerol é fornecido aos micróbios na ausência de pelo menos uma outra fonte de carbono fixa por um primeiro período de tempo, pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é fornecida no final do primeiro período de tempo, e os micróbios são cultivados por um segundo período de tempo na presença de pelo menos um outra fonte de carbono fixa.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a uma célula de microalgas contendo um gene exógeno, em que o gene exógeno codifica uma proteína selecionada do grupo que consiste de uma lipase, um transportador de sacarose, uma sacarose invertase, uma frutoquinase, ou uma enzima degradante de polissacarídeos. Em alguns casos, a célula é Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorella ellipsoidea, Chlorella sp. ou Chlorella protothecoides. Em outros casos, a célula é outra espécie de microalga, como aqui descrito.

Em alguns casos, o gene exógeno está em ligação operacional com um promotor. Em alguns casos, o promotor é induzível ou repreensível em resposta a um estímulo. Em várias modalidades, o estímulo é seleccionado do grupo constituído por uma pequena molécula produzida exogenamente, calor, frio e luz. Em alguns casos, o gene exógeno é expressado em um compartimento celular. Em algumas modalidades, o compartimento celular é selecionado do grupo consistindo de um cloroplasto e de uma mitocôndria.

Em alguns casos, o gene codifica uma lipase que tenha pelo menos 70% de identidade de aminoácidos com uma lipase selecionada da Tabela 9. Em uma modalidade, a lipase é Novozym-435. Em uma modalidade, a enzima degradante de polissacarídeos é endógena a um *Chlorella vírus* .

Em outro aspecto, a presente invenção é dirrecionada a uma célula de microalga com dois genes exógenos, em que um primeiro gene exógeno codifica uma lipase e um segundo gene exógeno codifica uma enzima que degrada polissacarídeos. Em alguns casos, cada um dos genes exógenos está em ligação operacional com um promotor. Em alguns casos, cada um dos dois genes exógenos está em ligação operacional com promotores que são induzíveis em resposta a um estímulo. Em alguns casos, cada um dos dois genes exógenos está em ligação operacional com promotores que são induzíveis em resposta ao mesmo estímulo. Em alguns casos, cada um dos genes exógenos está em ligação operacional com um promotor que é induzível em resposta a pelo menos um estímulo que não induz o outro promotor.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de produção de uma molécula de lipídio em um micróbio. Em uma modalidade, o método compreende (a) cultivar o micróbio por um primeiro período de tempo, suficiente para aumentar a densidade celular, onde o micróbio contém (i) um gene exógeno que codifica uma lipase e/ou (ii) um gene exógeno que codifica uma enzima que degrada polissacarídeos, em que o(s) gene(s) exógeno(s) estão em ligação operacional com um promotor que é indutível em resposta a um estímulo, (b) fornecer o estímulo, e (c) incubar o micróbio por um segundo período de tempo na presença do estímulo.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de produção de uma molécula de lipídio em um micróbio. Em uma modalidade, o método compreende (a) cultivar um micróbio produtor de lipídios por um primeiro período de tempo, suficiente para aumentar a densidade celular, (b) fornecer um vírus capaz de infectar e lisar o micróbio, quando em contato direto com ele, e (c), incubar o micróbio por um segundo período de tempo para produzir biomassa aquosa lisada. Em uma modalidade, o método compreende ainda extrair moléculas de lipídios da biomassa aquosa lisada.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a uma célula de microalga contendo um gene exógeno, em que esse gene codifica um cofator para uma enzima de via lipídica ou codifica uma proteína que participa da síntese do cofator.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de cultura de um micróbio produtor de lipídios. Em uma modalidade, o método compreende cultivar o micróbio na presença de uma quantidade suficiente de um ou mais co-fator(es) para uma enzima de via lipídica para aumentar a produção de lipídios microbianos sobre a a produção de lipídios microbianos na ausência de um ou mais dos referidos cofactores. Em alguns casos, um ou mais co-fatores é uma vitamina exigida por uma ou mais enzimas de via lipídica. Em uma modalidade, um ou mais co-fatores é biotina. Em alguns casos, um ou mais co-fatores é/são fornecidos pela inclusão na cultura de um micróbio geneticamente modificado para produzir um ou mais co-fatores.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de fermentação de um microorganismo que compreende fornecer uma mistura de glicose e xilose como fonte de energia para o microrganismo. Em uma modalidade, a mistura compreende ainda lignina. Em uma modalidade, a mistura ainda compreende pelo menos uma espécie de furfural. Em alguns casos, a mistura é material celulósico despolimerizado. Em alguns casos, a mistura ainda compreende pelo menos uma enzima de utilização de sacarose. Em uma modalidade, a mistura compreende uma sacarose invertase.

Em alguns casos, o microorganismo é selecionado do grupo consistindo de *Bracteococcus minor, Chlorella ellipsoidea, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis,*

Bracteococcus medionucleatus, Chlorella minutissima, Chlorella ovalis, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella vulgaris, Parachlorella kessleri, Prototheca moriformis, e *Pseudochlorella aquatica*. Em outros casos, o microorganismo é outra espécie de microorganismo, como aqui descrito. Em alguns casos, o microrganismo foi geneticamente modificado para expressar um gene exógeno que codifica pelo menos uma enzima de modificação lipídica, uma enzima de modificação de hidrocarbonetos, ou uma enzima de utilização de sacarose.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de cultivar uma microalga, que compreende o cultivar a microalga em meio de cultura incluindo uma matéria-prima compreendendo pelo menos um substrato de carbono selecionado do grupo consistindo de um material celulósico, um açúcar de 5 carbonos, um açúcar de 6 carbonos e acetato. Em alguns casos, o substrato de carbono é a glicose e a microalga é de um gênero selecionado do grupo consistindo de *Chlorella, Parachlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus, Prototheca* e *Scenedesmus*. Em alguns casos, o substrato de carbono é a xilose e a microalga é de um gênero selecionado do grupo consistindo de *Chlorella, Pseudochlorella,* e *Prototheca*. Em alguns casos, o substrato de carbono é a sacarose e a microalga é de um gênero selecionado do grupo consistindo de *Chlorella,* e *Bracteococcus*. Em alguns casos, o substrato de carbono é a frutose e a microalga é de um gênero selecionado do grupo consistindo de *Chlorella, Parachlorella, Prototheca,* e *Scenedesmus*. Em alguns casos, o substrato de carbono é arabinose e a microalgas é *Chlorella sp*. Em alguns casos, o substrato de carbono é manose e a microalga é de um gênero selecionado do grupo consistindo de *Chlorella, Parachlorella, Bracteococcus, Prototheca,* e *Scenedesmus*. Em alguns casos, o substrato de carbono é a galactose e a microalga é de um gênero selecionado do grupo consistindo de *Bracteococcus, Parachlorella,* Chlorella, Pseudochlorella, Bracteococcus, e *Prototheca*. Em alguns casos, o substrato de carbono é o acetato e a microalga é de um gênero selecionado do grupo consistindo de Chlorella, Parachlorella e Prototheca.

Em uma modalidade, o meio de cultura ainda inclui pelo menos uma enzima de utilização de sacarose. Em alguns casos, a microalga foi geneticamente modificada para expressar um gene exógeno que codifica pelo menos uma enzima de modificação lipídica, uma enzima de modificação de hidrocarbonetos, ou uma enzima de utilização de sacarose. Em alguns casos, o meio de cultura inclui uma sacarose invertase.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de cultivo de microalgas que compreende a colocação de uma pluralidade de células de microalgas na presença de material celulósico despolimerizado. Em alguns casos, as microalgas são cultivadas na presença de uma fonte de carbono fixa adicional selecionada do grupo que

consiste de glicerol, sacarose, glicose, arabinose, galactose, xilose, frutose, arabinose, manose, acetato, e qualquer combinação destes materiais. Em uma modalidade, as microalgas são cultivadas na presença de pelo menos uma enzima de utilização de sacarose.

Em alguns casos, as microalgas são selecionadas a partir de uma espécie do gênero Bracteococcus, uma espécie do gênero Chlorella, uma espécie do gênero Parachlorella, uma espécie do gênero Prototheca, ou uma espécie do gênero Pseudochlorella. Em alguns casos, as microalgas são selecionadas dentre Bracteococcus minor, Chlorella ellipsoidea, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Bracteococcus medionucleatus, Chlorella minutissima, Chlorella ovalis, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella vulgaris, Parachlorella kessleri, Prototheca moriformis, e Pseudochlorella aquatica. Em outros casos, as microalgas são outra espécie de microalgas, como aqui descrito.

Em algumas modalidades, as microalgas foram geneticamente modificadas para expressar um gene exógeno que codifica pelo menos uma enzima de modificação lipídica, uma enzima de modificação de hidrocarbonetos, ou uma enzima de utilização de sacarose. Em uma modalidade, pelo menos uma enzima de utilização de sacarose é uma sacarose invertase. Em alguns casos, pelo menos uma enzima modificação lipídica é selecionada a partir de um estearoil-ACP desaturase, de um glicerolipídeo desaturase, de um piruvato desidrogenase, de uma acetil-CoA carboxilase, e de um glicerol-3 fosfato aciltransferase. Em alguns casos, pelo menos uma enzima de modificação de hidrocarbonetos é selecionada a partir de uma tioesterasede acil-ACP graxo, uma redutase de acil-CoA graxo, um aldeído redutase graxo, um acyl-CoA graxo/aldeído redutase, um aldeído decarbonilase graxo, e uma proteína transportadora de acila.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de cultivar um micróbio produtor de lipídios, compreendendo o método cultivar o micróbio na presença de ácido acético e na ausência de uma fonte de nitrogênio fixa. Em alguns casos, o micróbio é cultivado na presença de uma quantidade de ácido acético suficiente para aumentar a produção lipídica microbiana sobre a produção lipídica microbiana na ausência de ácido acético, onde as condições de cultura são de outra maneira a mesma entre as duas culturas.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a uma cultura microbiana contendo uma população de microorganismos e meio de cultura composto de glicose, xilose e de uma molécula selecionada do grupo composto de lignina e uma espécie de furfural. Em alguns casos, os microorganismos são selecionados dentre Bracteococcus minor, Chlorella ellipsoidea, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Bracteococcus

medionucleatus, Chlorella minutissima, Chlorella ovalis, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella vulgaris, Parachlorella kessleri, Prototheca moriformis, e Pseudochlorella aquatica. Em outros casos, os microorganismos são outra espécie de microorganismo, como aqui descrito.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de cultura de microalgas. Em uma modalidade, o método compreende (a) fornecer uma célula de microalgas capaz de realizar o crescimento de heterotróficos, (b) colocar a célula de microalgas em meios de crescimento, onde tal meio compreende material celulósico despolimerizado, e (c) incubar as microalgas por um período de tempo suficiente para permitir que a célula cresça.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de produção de biodiesel. Em uma modalidade, o método compreende (a) cultivar um microorganismo produtor de lipídios em uma primeira cultura microbiana, (b) recuperar lipídios da biomassa produzida pela primeira cultura microbiana, (c) submeter os lipídios à transesterificação para produzir ésteres de ácidos graxos e glicerol, e (d) adicionar o glicerol à segunda cultura microbiana. Em alguns casos, a primeira e a segunda culturas microbianas são culturas da mesma espécie do microorganismo. Em alguns casos, a segunda cultura microbiana compreende microrganismos selecionados do grupo consistindo de *Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp.*, e *Chlorella sorokiniana*. Em outros casos, a segunda cultura microbiana compreende outra espécie de microorganismo, como aqui descrito.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de fermentação que compreende cultivar um microorganismo, na presença de glicerol e de pelo menos uma outra fonte de carbono fixa. Em alguns casos, o glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa são fornecidos aos microorganismos simultaneamente em uma proporção predeterminada. Em alguns casos, todo o glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa são fornecidos para os microorganismos no início da fermentação. Em alguns casos, todo o glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono fixa são alimentados aos microorganismos em uma proporção predeterminada ao longo do curso da fermentação. Em uma modalidade dro método, o glicerol é fornecido aos microorganismos na ausência de pelo menos uma outra fonte de carbono fixa por um primeiro período de tempo, pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é fornecida no final do primeiro período de tempo, e o microorganismo é cultivado por um segundo período de tempo na presença de pelo menos uma outra fonte de carbono fixa. Em uma modalidade, pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é alimentada ao microrganismo em uma proporção predeterminada durante

o segundo período de tempo. Em alguns casos, toda a outra fonte de carbono fixa é fornecida ao microorganismo no final do primeiro período de tempo. Em uma modalidade do método, a outra fonte de carbono fixa é fornecida ao microorganismo na ausência de glicerol por um primeiro período de tempo, o glicerol é fornecido ao final do primeiro período de tempo, e o microorganismo é cultivado por um segundo período de tempo na presença de glicerol. Em uma modalidade, o glicerol é um subproduto de um processo de transesterificação. Em uma modalidade, o glicerol é acidulado. Em outra modalidade, o glicerol não é acidulado. Em alguns casos, pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é a glicose. Em alguns casos, pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é material celulósico despolimerizado. Em uma modalidade, a pelo menos uma outra fonte de carbono fixa é sacarose.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um fermentador compreendendo uma população de microorganismos, glicerol e pelo menos um açúcar, selecionado do grupo consistindo de xilose, glicose e sacarose. Em uma modalidade, o glicerol é um subproduto de um processo de transesterificação de lipídeos. Em alguns casos, os microrganismos são selecionados do grupo consistindo de Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp., e Chlorella sorokiniana. Em outros casos, os microorganismos são outra espécie, como aqui descrito.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de fermentação de microorganismos. Em uma modalidade, o método compreende fornecer subproduto de glicerol de um processo de transesterificação como única fonte de energia de carbono fixa. Em uma modalidade, a energia da luz não é fornecida ao microrganismo. Em outra modalidade, a energia da luz é fornecida para o microrganismo. Em alguns casos, o microrganismo é selecionado dentre Parachlorella kessleri, Chlorella protothecoides, Bracteococcus medionucleatus, Prototheca moriformis, Chlorella minutissima, Chlorella sp., e Chlorella sorokiniana. Em outros casos, o microorganismo é outra espécie, como aqui descrito.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um microorganismo que contenha um gene de utilização de sacarose exógeno. Em uma modalidade, o gene codifica um transportador de sacarose. Em uma modalidade, o gene codifica uma sacarose invertase. Em uma modalidade, o gene codifica uma frutoquinase. Em alguns casos, o microrganismo é uma espécie selecionada do grupo consistindo de *Chlorella minutissima, Chlorella emersonii, Chlorella sorokiniana, Chlorela ellipsoidea, Chlorella sp.*, ou *Chlorella protothecoides* . Em outros casos, o microorganismo é outra espécie, como aqui descrito.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a uma célula das espécies *Chlorella protothecoides, Chlorella emersonii, ou Chlorella minutissima* em que a célula contém um gene exógeno. Em alguns casos, o gene exógeno codifica uma proteína selecionada do grupo que consiste de um transportador de sacarose, uma sacarose invertase, uma enzima de modificação lipídica, uma enzima de modificação de hidrocarbonetos e uma frutoquinase. Em algumas modalidades, a proteína é uma sacarose invertase secretada no espaço extracelular. Em algumas modalidades, a proteína é uma sacarose invertase direcionada ao citoplasma.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a uma cultura microbiana contendo uma população de microorganismos, e um meio de cultura que compreende (i) a sacarose e (ii) uma enzima sacarose invertase.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida para uma cultura microbiana contendo uma população de microorganismos, e um meio de cultura que compreende (i) melaço e (ii) uma enzima sacarose invertase.

Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a uma cultura microbiana contendo uma população de microorganismos, e um meio de cultura que compreende (i) a sacarose, (ii) a lignina, e (iii) uma enzima sacarose invertase.

Em várias culturas microbianas descritas acima, os microorganismos contêm pelo menos um gene de utilização de sacarose exógeno. Em algumas modalidades, o gene de utilização de sacarose codifica um transportador de sacarose, uma sacarose invertase, uma hexoquinase, uma glucoquinase, ou uma frutoquinase. Em uma modalidade, a enzima sacarose invertase é uma enzima sacarose invertase secretável codificada por um gene de sacarose invertase exógeno expressado pela população de microorganismos. Em alguns casos, os microorganismos contêm pelo menos um gene exógeno que codifica uma enzima de via lipídica ou uma enzima de modificação de hidrocarbonetos.

Em outro aspecto, a presente invenção é diriecionada a um ácido nucléico que compreende um cDNA que codifica um gene de utilização de sacarose, e um cDNA que codifica uma proteína que confere resistência ao antibiótico higromicina ou o antibiótico G418.

Em modalidades dos vários métodos, composições, células, microorganismos, microbios, culturas microbianas, fermentadores e similares descritos acima, o microorganismo ou microbio pode ser microalgas, uma levedura oleaginosa, um fungo ou uma bactéria, a menos que seja especificado em contrário. Em alguns casos, o microorganismo é selecionado do grupo consistindo de microalgas listados na Tabela 1. Em alguns casos, o microrganismo é uma espécie do gênero *Chlorella*. Em alguns casos, o microorganismo é selecionado do grupo consistindo de *Chlorella anitrata, Chlorella*

*antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida , Chlorella capsulata, Chlorella desiccata, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. Actophila, Chlorella infusionum var. Auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. Lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. airidis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella,*e Chlorella zofingiensis. Em alguns casos, o microorganismo é uma levedura oleaginosa selecionada do grupo consistindo de Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Candida sp., Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipofer, Endomycopsis vernalis, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula gracilis, e Yarrowia lipolítica. Em alguns casos, o microorganismo é um fungo selecionado do grupo que consiste em uma espécie do gênero Mortierella, Mortierria vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum , uma espécie do gênero Hensenulo, uma espécie do gênero Chaetomium, uma espécie do gênero Cladosporium, uma espécie do gênero Malbranchea, uma espécie do gênero Rhizopus, e uma espécie do gênero Pythium.

Nas várias modalidades descritas acima, o microorganismo contém pelo menos um gene de utilização de sacarose exógeno. Em alguns casos, o gene de utilização de sacarose codifica um transportador de sacarose, uma sacarose invertase, uma hexoquinase, uma glucoquinase, ou uma frutoquinase.

Em várias modalidades acima descritas, o microrganismo pode conter pelo menos um gene exógeno que codifica uma enzima de via lipídica. Em alguns casos, a enzima de via lipídica é selecionada do grupo consistindo de um estearoil-ACP desaturase, um glicerolipídeo desaturase, um piruvato desidrogenase, um acetil-CoA carboxilase, uma proteína transportadora de acila, e um glicerol-3 fosfato aciltransferase.

Nas várias modalidades descritas acima, o microorganismo pode conter pelo menos um gene exógeno para codificar uma enzima de modificação de hidrocarbonetos. Em alguns casos, a enzima de modificação de hidrocarbonetos é selecionada de um grupo que consiste em uma tioesterase de acil-ACP graxo, um acil-CoA graxo/aldeído redutase, uma

redutase de acil-CoA graxo, um aldeído redutase graxo, um aldeído decarbonilase graxo, e/ou uma proteína transportadora de acila.

Quaisquer duas ou mais das várias modalidades descritas acima podem ser combinadas para produzir modalidades adicionais inseridas no âmbito da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra o peso seco de células por litro de múltiplas espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol com e sem glicose adicional.

A figura 2 mostra o peso seco de células por litro de múltiplas espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol com glicose adicional.

A figura 3 mostra a concentração relativa de lipídios de culturas de múltiplas espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol com glicose adicional.

A figura 4 mostra a concentração lipídica de culturas de várias espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol com e sem glicose adicional.

A figura 5 mostra os lipídios como uma porcentagem do peso celular seco de duas espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol com glicose adicional, onde o glicerol é adicionado sequencialmente após a glicose.

A figura 6 mostra os lipídios como uma porcentagem do peso celular seco de duas espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol com glicose adicional.

A figura 7 mostra a concentração relativa de lipídios de culturas de múltiplas espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de 2% de glicose e 1% de glicose + 1% de glicerol de grau reagente.

A figura 8 mostra os lipídios como uma porcentagem do peso celular seco de múltiplas espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de glicose, com e sem glicerol de grau reagente, em que o glicerol é adicionado sequencialmente ou combinado com a glicose .

A figura 9 mostra a concentração relativa de lipídios de culturas de múltiplas espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol com glicose adicional, onde o glicerol é adicionado saquencialmente ou combinado com glicose.

A figura 10 mostra o peso celular seco por litro de múltiplas espécies e subespécies de *Chlorella* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol com glicose adicional, onde o glicerol é adicionado saquencialmente ou combinado com glicose.

Figura 11 (a) mostra os lipídios como uma porcentagem do peso celular seco de Spirulina platensis quando cultivadas na presença de glicose, glicerol de grau reagente, glicerol subproduto de biodiesel não-acidulado, e uma combinação de glicerol e glicose.

A figura 11(b) mostra os lipídios como uma porcentagem do peso celular seco de *Navicula pelliculosa* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol e na presença de combinações de glicerol e glicose.

A figura 12(a) mostra os lipídios como uma porcentagem do peso celular seco de *Scenedesmus armatus* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol e na presença de uma combinação de glicerol e glicose.

A figura 12(b) mostra o peso celular seco por litro de *Scenedesmus armatus* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol e na presença de uma combinação de glicerol subproduto de biodiesel e glicose.

A figura 13 mostra o peso celular seco por litro de *Navicula pelliculosa* quando cultivadas na presença de vários tipos de glicerol e na presença de uma combinação de glicerol subproduto de biodiesel não-acidulado e glicose.

A figura 14 mostra o peso celular seco por litro de *Scenedesmus armatus* e *Navicula pelliculosa* quando cultivadas na presença de glicerol subproduto de biodiesel acidulado e não-acidulado com a glicose adicional, onde o glicerol é adicionado sequencialmente ou em combinação com a glicose .

A figura 15 mostra um efeito sinérgico de uma combinação de xilose e glicose sobre o crescimento de *Chlorella* em comparação com xilose ou somente glicose.

A figura 16 mostra genotipagem de transformantes de *Chlorella protothecoides* contendo um gene exógeno.

A figura 17 mostra o uso do codão de *Chlorella protothecoides*.

A figura 18 mostra o uso do codão de *D. Salina* e de *Chlorella pyrenoidosa*.

A Figura 19 mostra (a) glicerol de grau reagente, (b) glicerol subproduto de biodiesel não-acidulado, e (c) glicerol subproduto de biodiesel acidulado, todos utilizados em experiências descritos nos exemplos.

A figura 20 mostra o crescimento de *Chlorella protothecoides* em glicose e frutose.

A figura 21 mostra o crescimento de Chlorella *fusca* em 1% de sacarose.

A figura 22 mostra o crescimento de Chlorella *kessleri* em 1% de sacarose.

A figura 23 mostra o peso celular seco por litro de *Chlorella protothecoides* quando cultivadas na presença de glicose, sacarose, ou uma das várias amostras de melaço

(designadas BS1 BS2 e HTM), na presença ou na ausência de uma sacarose invertase.

A figura 24 mostra o crescimento de *Chlorella protothecoides quando cultivadas na presença de glicose, sacarose, ou uma das várias amostras de melaço (designadas BS1 BS2 e HTM), na presença ou na ausência de uma sacarose invertase, como medido pela densidade celular relativa.*

A figura 25 mostra uma ilustração de vários constructos de plasmídeos de invertase de levedura (SUC2), com três diferentes promotores (designados CMV, CV e HUP1), bem como áreas de restrição úteis para subclonagem.

A figura 26 mostra a genotipagem de transformantes de *Chlorella protothecoides* selecionados em sacarose no escuro contendo um gene de sacarose invertase exógeno.

A figura 27 mostra a genotipagem de células de *Chlorella protothecoides* transformadas com um gene que codifica uma sacarose invertase secretada de *S. cerevisiae*.

A figura 28 mostra genotipagem de células de *Chlorella minutissima* e *Chlorella emersonii* transformadas com um gene que codifica uma sacarose invertase secretada de *S. cerevisiae*.

A figura 29 ilustra um cromatografia a gás gerada pela análise de um produto diesel renovável produzido de acordo com os métodos da presente invenção, e descrito no Exemplo 27.

A figura 30 ilustra um gráfico de distribuição de pontos de ebulição de um produto diesel renovável produzido de acordo com os métodos da presente invenção, e descrito no Exemplo 27.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. DEFINIÇÕES

A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o sentido normalmente entendido por um perito no assunto ao qual pertence esta invenção. As referências a seguir fornecem um perito uma definição geral de muitos dos termos utilizados no presente invento: Singleton et al. , Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2 ed.1994); Cambridge Dictionary of Science and Technolog y (Walker, ed., 1988); O Glossário de Genética & TB ;, Ed 5. *Rieger et al.* (eds.), Springer Verlag (1991) e Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). Como usados aqui, os seguintes termos têm os significados a eles atribuídos, salvo especificação em contrário.

Como usado com referência a um ácido nucléico, "ativo em microalgas" refere-se a um ácido nucleico que é funcional em microalgas. Por exemplo, um promotor que tem sido utilizado para conduzir um gene de resistência a antibióticos para conferir resistência a

antibióticos para uma microalga transgênica é ativo em microalgas. Exemplos de promotores ativos em microalgas são os promotores endógenos para certa espécie de algas e promotores encontrados nos vírus de plantas.

Uma "proteína transportadora de acila" ou "ACP" é uma proteína que se liga uma cadeia acila crescente durante a síntese de ácidos graxos como um éster tiol no tiol distal da metade 4'-fosfopanteteína e compreende uma componente do complexo ácido graxo sintase. A frase "naturalmente co-expressa", com referência a uma proteína transportadora de acila em conjunção com uma tioesterase de acil-ACP graxo, significa que a ACP e a tioesterase são co-expressas naturalmente em um tecido ou organismo do qual são derivadas, por exemplo, porque os genes que codificam as duas enzimas estão sob o controle de uma seqüência regulatória comum ou porque são expressas em resposta ao mesmo estímulo.

Uma "molécula acil-CoA" ou "acil-CoA" é uma molécula que compreende uma metade de acila covalentemente ligada à coenzima A através de uma ligação éster tiol no tiol distal da metade 4'-fosfopanteteína da coenzima A.

"Axênica", significa uma cultura de um organismo que é livre de contaminação por outros organismos vivos.

"Biodiesel é um éster de alquila de ácido graxo produzido biologicamente, adequado para uso como combustível em um motor a diesel.

O termo "biomassa" refere-se ao material produzido pelo crescimento e/ou propagação das células. A biomassa pode conter células e/ou conteúdo intracelular, bem como material extracelular. O material extracelular inclui, entre outros, os compostos secretados por uma célula.

"Bioreator" significa é um cercado ou cercado parcial no qual as células são cultivadas, opcionalmente, em suspensão.

Conforme utilizado aqui, um "catalisador" refere-se a um agente, tal como uma molécula ou complexo macromolecular, capaz de facilitar ou promover uma reação química de um reagente em um produto sem se tornar uma parte do produto. Assim, um catalisador aumenta a taxa de uma reação, após a qual o catalisador pode atuar em outro reagente para formar o produto. Um catalisador normalmente diminui a energia de ativação total necessária para a reação, de modo que ela proceda mais rapidamente ou com uma temperatura mais baixa. Assim, um equilíbrio de reação pode ser mais rapidamente alcançado. Exemplos de catalisadores incluem as enzimas, que são catalisadores biológicos, o calor, que é um catalisador não-biológico, e os catalisadores de metais utilizados nos processos de refino de petróleo fóssil.

"Material celulósico" significa os produtos da digestão de celulose, incluindo

glicose e xilose e, opcionalmente, os compostos adicionais como dissacarídeos, oligossacarídeos, lignina, furfuróis e outros compostos. Exemplos não limitantes de fontes de material celulósico incluiem bagaços de cana-de-açúcar, polpa de açúcar de beterraba, resíduos de milho, lascas de madeira, serragem e grama.

O termo "co-cultura" e suas variantes, como "co-cultivo", referem-se à presença de dois ou mais tipos de células no mesmo biorreator. Os dois ou mais tipos de células podem ser tanto microrganismos, como microalgas, quanto uma célula de microalgas cultivadas com um tipo de célula diferente. As condições de cultura podem ser aquelas que promovem crescimento e/ou a propagação dos dois ou mais tipos celulares, ou aquelas que facilitam o crescimento e/ou a proliferação de uma das duas ou mais células, ou um subconjunto delas, enquanto mantém o crescimento celular para o restante.

O termo "co-fator" é aqui utilizado para se referir a qualquer molécula, além do substrato, que é necessária para uma enzima exercer sua atividade enzimática.

Como usado aqui, "DNA complementar" ("cDNA") é uma representação do DNA do mRNA, geralmente obtido por transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) ou amplificação (por exemplo, através de reação em cadeia da polimerase ("PCR")).

O termo "cultura" e suas variantes, referem-se à promoção intencional de crescimento (aumento do tamanho celular, do conteúdo celular e/ou da atividade celular) e/ou propagação (aumento do número celular por mitose) de uma ou mais células através da utilização das condições de cultura pretendidas. A combinação de crescimento e propagação pode ser chamada de proliferação. Uma ou mais células podem ser aquelas de um microorganismo, como as microalgas. Exemplos de condições previstas incluem a utilização de um meio definido (com características conhecidas, tais como pH, força iônica, e fonte de carbono), temperatura especificada, tensão de oxigênio, níveis de dióxido de carbono, e crescimento em um biorreator. O termo não se refere ao crescimento nem à propagação de microrganismos na natureza ou sem intervenção humana direta, como o crescimento natural de um organismo que, em última análise, se torna fossilizado para produzir óleo cru geológico.

Conforme utilizado aqui, o termo "citólise" refere-se a lise das células em um ambiente hipotônico. A citólise é causada por osmose excessiva, ou o movimento de água para o interior de uma célula (hiper-hidratação). A célula não pode suportar a pressão osmótica da água no interior, e assim explode.

Como usado aqui, os termos "vetor de expressão" ou "construto de expressão" se refere a um construto de ácido nucleico, gerado recombinante ou sinteticamente, com uma série de elementos de ácido nucléico determinados que permitem a transcrição de um determinado ácido nucléico em uma célula hospedeira. O vetor de expressão pode ser parte

de um plasmídeo, de um vírus, ou de um fragmento de ácido nucléico. Normalmente, o vetor de expressão inclui um ácido nucléico para ser transcrito ligado operavelmente a um promotor.

"Gene exógeno" se refere a um ácido nucleico transformado em uma célula. Uma célula transformada pode ser referida como uma célula recombinante, em que gene(s) exógeno(s) adicional(is) pode(m) ser introduzido(s). O gene exógeno pode ser de uma espécie diferente (e assim heteróloga), ou da mesma espécie (e assim homóloga) em relação à célula que está sendo transformada. No caso de um gene homólogo, ele ocupa uma posição diferente no genoma da célula em relação à cópia endógena do gene. O gene exógeno pode estar presente em mais de uma cópia da célula. O gene exógeno pode ser mantido em uma cela como uma inserção no genoma, ou como uma molécula episomal.

"Fornecido exogenamente" descreve uma molécula fornecida para o meio de cultura de uma cultura de células.

Conforme utilizado aqui, uma "tioesterase de acil-ACP graxo" é uma enzima que catalisa a clivagem de um ácido graxo de uma proteína transportadora de acila (ACP), durante a síntese de lipídios.

Conforme utilizado aqui, um "acil-CoA graxo/aldeído reductase" é uma enzima que catalisa a redução de uma molécula de acil-CoA em um álcool primário.

Conforme utilizado aqui, uma "redutase de acil-CoA graxo" é uma enzima que catalisa a redução de uma molécula de acil-CoA em um aldeído.

Conforme utilizado aqui, um "aldeído decarbonilase graxo" é uma enzima que catalisa a conversão de um aldeído graxo em um alcano.

Conforme utilizado aqui, um "aldeído redutase graxo" é uma enzima que catalisa a redução de um aldeído em um álcool primário.

"Fonte de carbono fixa" significa molécula(s) contendo carbono, de preferência orgânico, que estão presentes à temperatura e pressão ambiente no estado sólido ou líquido.

"Fungo", como utilizado aqui, significa organismos heterotróficos caracterizados por uma parede celular quitinosa do reino dos fungos.

"Homogeneizado" significa biomassa que foi fisicamente rompida.

Como usado aqui, "hidrocarboneto" refere-se a: (a) uma molécula contendo apenas átomos de hidrogênio e carbono em que os átomos de carbono são covalentemente ligados para formar uma estrutura linear, ramificada, cíclica ou parcialmente cíclica a qual os átomos de hidrogênio estão ligados, ou (b) uma molécula que apenas primariamente contém átomos de hidrogênio e de carbono e que pode ser convertida para conter somente átomos de hidrogênio e carbono por uma a quatro reações químicas. Exemplos não

limitantes deste último incluem hidrocarbonetos contendo um átomo de oxigênio entre um átomo carbono e um de hidrogênio para formar uma molécula de álcool, bem como aldeídos contendo um átomo de um oxigênio. Métodos para a redução dos álcoois em hidrocarbonetos contendo apenas átomos de carbono e hidrogênio são bem conhecidos. Outro exemplo de um hidrocarboneto é um éster, em que um grupo orgânico substitui um átomo de hidrogênio (ou mais de um), em um ácido de oxigênio. A estrutura molecular de compostos de hidrocarbonetos varia desde as mais simples, na forma de metano (CH_4), que é um componente do gás natural, até as muito pesadas e muito complexas, como algumas moléculas tais como asfaltenos, encontradas no óleo cru, no petróleo, e em betumes. Hidrocarbonetos podem estar na forma gasosa, líquida ou sólida, ou qualquer combinação destas formas, e podem ter uma ou mais ligações duplas ou triplas entre átomos de carbono adjacentes na estrutura. Assim, o termo inclui alcanos lineares, ramificados, cíclicos ou parcialmente cíclicos, alquenos, lipídios e parafina. Exemplos incluem o propano, butano, pentano, hexano, octano, trioleína, e esqualeno.

"Enzima de modificação de hidrocarbonetos" se refere a uma enzima que modifica a estrutura covalente de um hidrocarboneto. Exemplos de enzimas de modificação de hidrocarbonetos incluem lipase, tioesterasede acil-ACP graxo, um acyl-CoA graxo/aldeído redutase, uma redutase de acil-CoA graxo, um aldeído redutase graxo, e um aldeído decarbonilase graxo. Compostos produzidos pela atividade enzimática das enzimas de modificação de hidrocarbonetos, incluindo os ácidos graxos, álcoois, aldeídos, alcanos, ou outros compostos derivados, são chamados aqui indistintamente de hidrocarbonetos ou lipídios.

O termo "hidrogênio: proporção de carbono" se refere à proporção de átomos de hidrogênio para átomos de carbono em uma molécula em uma base de átomo-átomo. A proporção pode ser usada para se referir ao número de átomos de carbono e de hidrogênio em uma molécula de hidrocarboneto. Por exemplo, o hidrocarboneto com a proporção mais elevada é o metano CH_4 (4:1).

"Fração Hidrofóbica" refere-se à parte, ou fração, de um material que é mais solúvel em uma fase hidrofóbica em comparação com uma fase aquosa. Uma fração hidrofóbica é substancialmente insolúvel em água e geralmente não-polar.

Como usado neste documento, a expressão "aumento da produção de lipídios" refere-se a um aumento da produtividade de uma cultura microbiana, por exemplo pelo aumento de peso seco de células por litro de cultura, aumentando a porcentagem de células que constituem lipídio, ou ao aumento da quantidade total de lipídios por litro de volume de cultura por unidade de tempo.

Um "promotor indutível" é aquele que medeia a transcrição de um gene ligado

operacionalmente em resposta a um estímulo particular.

Conforme utilizada aqui, a expressão "em ligação operacional" se refere a uma ligação funcional entre duas seqüências, como uma seqüência de controle (tipicamente um promotor) e na seqüência de ligação. O promotor está em ligação operacional com um gene exógeno se pode mediar a transcrição do gene.

O termo "in situ" significa "no lugar" ou "na sua posição original". Por exemplo, uma cultura pode conter uma primeira microalga secretando um catalisador e um segundo microorganismo secretando um substrato, onde o primeiro e o segundo tipos de célula produzem os componentes necessários para uma reação química em particular ocorrer in situ da co-cultura sem a necessidade de mais separação ou processamento dos materiais.

Uma "concentração limitante de um nutriente" é uma concentração em uma cultura que limita a propagação de um organismo em cultura. Uma "concentração não-limitante de um nutriente" é uma concentração que suporta a propagação máxima durante um determinado período de cultura. Assim, o número de células produzidas durante um determinado período de cultura é menor na presença de uma concentração limitante de um nutriente do que quando o nutriente não é limitante. Um nutriente é considerado "em excesso" em uma cultura quando o nutriente está presente em uma concentração maior do que aquela que suporta a propagação máxima.

Conforme utilizado aqui, uma "lipase" é uma enzima solúvel em água que catalisa a hidrólise de ligações éster em substratos lipídicos insolúveis em água. Lipases catalisam a hidrólise de lipídios em gliceróis e ácidos graxos.

Conforme utilizado aqui, uma "enzima de via lipídica" é uma enzima que desempenha um papel no metabolismo lipídico, ou seja, tanto a síntese lipídica, quanto a modificação ou a degradação. Este termo engloba as proteínas que modificam quimicamente os lipídios, bem como as proteínas transportadoras.

"Lipídeos" são uma classe de hidrocarbonetos que são solúveis em solventes apolares (como éter e clorofórmio) e são relativamente ou totalmente insolúveis em água. Moléculas lipídicas têm essas propriedades porque consistem em grande parte de longas caudas de hidrocarbonetos que são hidrofóbicas na natureza. Exemplos de lipídios incluem ácidos graxos (saturados e insaturados); glicerídeos ou glicerolipídeos (tais como monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos ou gorduras neutras, e fosfoglicerídeos ou glicerofosfolipídeos); não-glicerideos (esfingolipídeos, lipídios esteróis, incluindo o colesterol e os hormônios esteróides, lipídios prenois incluindo terpenóides, álcoois graxos, ceras e policetídeos) e lipídios complexos derivados (lipídios de açúcar ligado, ou glicolipídeos, e lipídios de proteína ligada). "Gorduras" são um subgrupo de lipídios chamado "triacilglicerídeos."

Conforme utilizado aqui, o termo "lisado" refere-se a uma solução contendo o conteúdo das células lisadas.

Conforme utilizado aqui, o termo "lise" refere-se à ruptura da membrana plasmática e, opcionalmente, da parede celular de um organismo biológico o suficiente para liberar pelo menos parte do conteúdo intracelular, geralmente através de mecanismos mecânicos, virais ou osmóticos que comprometem sua integridade.

Conforme utilizado aqui, o termo "lisar" refere-se a romper a membrana celular e, opcionalmente, a parede celular de uma célula ou organismo biológico o suficiente para liberar pelo menos parte do conteúdo intracelular.

"Microalga" significa um organismo microbiano eucariota que contém um cloroplasto, e, opcionalmente, que é capaz de realizar a fotossíntese, ou um organismo microbiano procariota capaz de realizar a fotossíntese. Microalgas incluem fotoautótrofos obrigados, que não podem metabolizar uma fonte de carbono fixa como energia, bem como heterótrofos, que podem viver exclusivamente fora de uma fonte de carbono fixa. Microalgas podem referir-se a organismos unicelulares que se separam a partir de células irmãs logo após a divisão celular, como *Chlamydomonas*, e também podem se referir aos micróbios, como, por exemplo, *Volvox*, que é um micróbio fotossintético multicelular simples de dois tipos de células distintos. "Microalga" também pode se referir a células como *Chlorella* e *Dunaliella*. "Microalgas" também inclui outros organismos fotossintéticos microbianos que exibem adesão célula-célula, como *Agmenellum*, *Anabaenae* *Pyrobotrys*. "Microalgas" inclui também microrganismos heterotróficos obrigados que perderam a capacidade de realizar fotossíntese, como certas espécies de algas dinoflageladas.

Os termos "microorganismo" e "micróbio" são utilizados alternadamente aqui para referir-se a organismos unicelulares microscópicos.

"Levedura oleaginosa", como utilizado aqui, significa que a levedura pode naturalmente acumular mais de 10% do seu peso celular seco como lipídios ou pode fazê-lo como resultado da engenharia genética. As leveduras oleaginosas incluem organismos como *Yarrowia lipolytica*, bem como cepas modificadas de levedura, tais como *Saccharomyces cerevisiae* que foram modificadas para acumular mais de 10% do seu peso celular seco como lipídios.

Conforme utilizado aqui, o termo "choque osmótico" refere-se à ruptura das células em uma solução na sequência de uma redução súbita da pressão osmótica. O choque osmótico é as vezes induzido para liberar componentes celulares dessas células em uma solução.

"Fotobioreator" se refere a um recipiente, em que pelo menos parte dele é

parcialmente transparente ou parcialmente aberta, permitindo a passagem de luz, no qual uma ou mais células de microalgas são cultivadas. Fotobiorreatores podem ser fechados, como no caso de um saco de polietileno ou um Erlenmeyer, ou podem ser abertos para o ambiente, como no caso de uma lagoa ao ar livre.

Conforme utilizado aqui, uma "enzima degradante de polissacarídeos" se refere a qualquer enzima capaz de catalisar a hidrólise, ou despolimerização, de qualquer polissacarídeo. Por exemplo, celulases catalisam a hidrólise da celulose.

"Polissacarídeos" (também chamados de "glycans") são carboidratos compostos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. A celulose é um exemplo de um polissacarídeo que compõe certas paredes celulares de plantas. A celulose pode ser despolimerizada por enzimas para produzir monossacarídeos como xilose e glicose, bem como dissacarídeos e oligossacarídeos maiores.

"Abertura", no contexto de um biorreator, refere-se a uma abertura no biorreator que permite influxo ou efluxo de materiais como gases, líquidos e células. As portas são normalmente conectadas à tubulação que vem do fotobiorreator.

Um "promotor" é definido como um conjunto de sequencias de controle de ácidos nucleicos que direcionam a transcrição de um ácido nucleico. Conforme utilizado aqui, um promotor inclui sequências de ácidos nucleicos necessárias perto do local de início da transcrição, tais como, no caso de uma polimerase tipo II promotora, um elemento TATA. Um promotor também inclui opcionalmente um intensificador distal ou elementos repressores, que podem ser localizados tanto quanto alguns milhares de pares de bases do local de início da transcrição.

Conforme utilizado aqui, o termo "recombinante", quando usado com referência, por exemplo, a uma célula, ou ácido nucléico, ou proteína, ou vetor, indica que a célula, o ácido nucléico, a proteína ou o vetor, foi modificado pela introdução de um ácido nucléico exógeno ou de uma proteína, ou pela alteração de um ácido nucléico nativo ou proteína, ou que a célula é derivada de uma célula que foi modificada. Assim, por exemplo, células recombinantes expressam os genes que não são encontrados dentro da forma nativa da célula (não recombinante) ou expressam genes nativos que são anormalmente expressos em contrário, nos termos expressos ou não expressos em tudo. O termo "ácido nucleico recombinante" aqui é significado de ácido nucléico, originalmente formado in vitro, em geral pela manipulação de ácido nucléico, por exemplo, usando polimerases e endonucleases, de uma forma normalmente não encontrada na natureza. Desta forma, a ligação operacional de diferentes seqüências é alcançada. Assim, um ácido nucleico isolado em forma linear ou um vetor de expressão formado in vitro pela ligação de moléculas de DNA, que normalmente não são unidos, são ambos considerados

recombinantes para os fins da presente invenção. Entende-se que uma vez um ácido nucleico recombinante é feito e reintroduzido em uma célula ou organismo hospedeiro, ele irá replicar de forma não recombinante, ou seja, usando a maquinaria celular in vivo da célula hospedeira, em vez de manipulações in vitro; no entanto, tais ácidos nucleicos, uma vez produzidos de forma recombinante, embora posteriormente replicados de forma não recombinante, ainda são considerados recombinantes para efeitos da invenção. Da mesma forma, uma "proteína recombinante" é uma proteína produzida através de técnicas de recombinação, isto é, através da expressão de um ácido nucleico recombinante como descrito acima.

Conforme utilizado aqui, o termo "diesel renovável" refere-se aos alcanos (como C:10:0, C12:0, C:14:0, C16:0 e C18:0) produzidos através de hidrogenação e desoxigenação de lipídios.

Conforme utilizado aqui, o termo "sonicação" se refere a um processo de interrupção de materiais biológicos, tais como uma célula, através da utilização da energia das ondas de som.

"Espécie de furfural" refere-se a 2-Furancarboxaldeído ou um derivado que mantém as mesmas características estruturais básicas.

Como usado aqui, "silagem" refere-se aos caules e folhas secos remanescentes de uma colheita após o grão ser colhido.

O "gene de utilização de sacarose" é um gene que, quando expresso, ajuda na capacidade de uma célula para utilizar sacarose como fonte de energia. Proteínas codificadas por um gene de utilização de sacarose são aqui referidas como "enzimas de uso de sacarose" e incluem os transportadores de sacarose, a sacarose invertase e hexoquinases como glucoquinases e frutoquinases.

"Água residual" é um resíduo aquoso que tipicamente contém água de lavagem, resíduos de lavanderia, fezes, urina e outros resíduos líquidos ou semi-líquidos. Ele inclui algumas formas de resíduos urbanos, bem como esgoto secundariamente tratado.

Para fins de comparação para determinar a porcentagem de identidade de nucleotídeos ou aminoácidos, geralmente uma seqüência atua como uma seqüência de referência, com a qual seqüências de teste são comparadas. Ao utilizar um algoritmo de comparação de seqüência, as seqüências de teste e de referência são colocadas em um computador, subsequencias coordenadas são designadas, se necessário, e os parâmetros de seqüência de programa de algoritmo são designadas. O algoritmo de comparação de seqüência, então, calcula a identidade de seqüência por cento para a sequência(s) do ensaio em relação à seqüência de referência, com base nos parâmetros do programa designado.

O alinhamento ótimo de seqüências para comparação pode ser realizado, *por*

exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), pela método de busca de similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. National. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementações computadorizada destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou por inspeção visual (ver geralmente Ausubel et al. supra).*

Outro algoritmo de exemplo que é adequado para determinar a identidade de seqüência por cento e a similaridade da seqüência é o algoritmo BLAST, que é descrito em *Altschul et al. J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). O software para a realização de análises BLAST está publicamente disponível através do Nacional Center for Biotechnology Information (at the web address www.ncbi.nlm.nih.gov). Este algoritmo envolve primeiro a identificação de pares de seqüência de resultado alto (HSPs), através da identificação de palavras curtas de comprimento W na seqüência de consulta, que correspondam ou satisfaçam algum resultado T no limite do valor positivo, quando alinhado com uma palavra de mesmo comprimento de um banco de dados. T é referido como o limite de pontuação da palavra próxima (*Altschul et al., Supra.*). Estes acertos das palavras próximas iniciais agem como sementes para o início de pesquisas para encontrar HSPs mais longas que as contenham. Os acertos de palavras são depois extendidos em ambas as direções ao longo de cada seqüência para tão longe quanto apontuação do alinhamento cumulativo possa ser aumentada. Pontuações cumulativas são calculadas usando, por seqüências de nucleotídeos, os parâmetros M (resultado de recompensa para um par de resíduos correspondentes; sempre >0) e N (resultado de pena para resíduos não correspondentes; sempre <0). Para as seqüências de aminoácidos, uma matriz de pontuação é usada para calcular a pontuação cumulativa. A extensão dos acertos de palavras em cada direção é interrompida quando: a pontuação de alinhamento cumulativa cai pela quantidade X de seu valor máximo atingido; a pontuação cumulativa vai a zero ou abaixo devido à acumulação de um ou mais alinhamentos de resíduos de resultado negativo; ou o fim de uma seqüência é alcançado. Para identificar se um ácido nucléico ou polipeptídeo está dentro do escopo da invenção, os parâmetros padrão dos programas BLAST são adequados. O programa BLASTN (para seqüências de nucleotídeos) usa como padrão um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, M = 5, N =- 4, e uma comparação de ambas os filamentos. Para as seqüências de aminoácidos, o programa BLASTP usa como padrão um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e a matriz de pontuação BLOSUM62. O programa TBLATN (utilizando seqüência da proteína parta seqüência de nucleotídeos) usa como padrão um comprimento de palavra

(W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e uma matriz de pontuação BLOSUM 62, (ver Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

Além de calcular identidade de seqüência por cento, o algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da semelhança entre duas seqüências (ver, *por exemplo*, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Uma medida de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma (P(N)), que fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma combinação entre dois nucleótidos ou seqüências de aminoácidos ocorreria por acaso. Por exemplo, um ácido nucléico é considerado semelhante a uma seqüência de referência se a menor probabilidade de soma em uma comparação do ácido nucléico de teste com o ácido nucléico de referência é inferior a cerca de 0,1, mais preferivelmente menos de cerca de 0,01 e mais preferivelmente menos que cerca de 0,001.

II. GERAL

A invenção está baseada, em parte, na percepção de que certos microorganismos podem ser usados para produzir óleos, combustíveis e outras composições de hidrocarbonetos ou lipídicas de modo econômico e em grandes quantidades, para uso no transporte de combustível, na indústria petroquímica, e/ou na indústria de alimentos e cosméticos, entre outras aplicações. Os microorganismos adequados incluem microalgas, leveduras oleaginosas e fungos. Um gênero preferido de microalgas para uso na invenção é a microalga produtora de lipídios *Chlorella*. A transesterificação dos lipídios longa produz ésteres de ácidos graxos de cadeia longa úteis como biodiesel. Outros processos enzimáticos e químicos podem ser adaptados para produzir ácidos graxos, aldeídos, álcoois, alcanos e alcenos. O presente pedido descreve métodos para a modificação genética de múltiplas espécies e cepas de microrganismos, incluindo *Chlorella* e micróbios semelhantes, para fornecer organismos com características que facilitam a produção de lipídios adequados para a conversão em óleos, combustíveis e óleos químicos. Em algumas aplicações, o diesel renovável, o combustível de jato, ou outros compostos de hidrocarbonetos são produzidos. O presente pedido também descreve métodos de cultivo de microalgas para aumentar a produtividade e produção de lipídeos melhorada, e/ou para uma produção de custos mais eficazes das composições aqui descritas.

Em modalidades particulares, o presente pedido descreve cepas geneticamente modificadas de microalgas com um ou mais genes exógenos. Por exemplo, microalgas que produzem altos níveis de triacilglicerídeos (TAG) adequado para o biodiesel podem ser projetadas para expressar uma lipase, que pode facilitar a transesterificação de microalgas TAG. A lipase opcionalmente pode ser expressa através de um promotor induzível, de modo que as células podem ser cultivadas primeiro em uma densidade desejável em um

fermentador e depois colhidas, seguidas de indução do promotor para expressar a lipase, opcionalmente na presença de álcool suficiente para conduzir a conversão de TAGs em ésteres de ácidos graxos.

Alguns lipídios das microalgas são seqüestrados nas membranas celulares e em outras partes não aquosas da célula. Portanto, para aumentar o rendimento da reação de transesterificação, pode ser benéfico lisar as células para aumentar a acessibilidade da lipase ao lipídio. O rompimento celular pode ser realizado, por exemplo, mecanicamente, através da adição de vapor sob pressão, ou através do emprego de um vírus que lisa as células de microalgas, expressando um gene para produzir uma proteína lítica na célula, ou tratar a cultura com um agente que lisa as células de microalgas. O tratamento com vapor de microalgas para rompimento celular é descrito, por exemplo, na Patente U.S. 6.750.048.

Também aqui divulgada é a engenharia genética de microalgas que produzem altos níveis de TAG para expressar um gene que lisa as células de microalgas, como por exemplo, um gene de um vírus lítico. Este gene pode ser expressado através de um promotor induzível, de modo que as células podem ser cultivadas primeiro a uma densidade desejável em um fermentador e depois colhidas, seguida de indução do promotor para expressar o gene para lisar as células. Um gene que codifica uma enzima que degrada polissacarídeos, por exemplo, pode ser expresso para lisar as células.

Opcionalmente, a lipase pode ser expressa em um compartimento intracelular, onde permanece separada da maioria dos lipídios de microalgas até a transesterificação. Geralmente, é preferível realizar a transesterificação após a água ter sido substancialmente removida da preparação e/ou um excesso de álcool ter sido adicionado. As lipases podem usar a água, assim como o álcool, como substrato na transesterificação. Com a água, os lipídios são conjugados a uma fração de hidroxila para produzir um ácido graxo polar, ao invés de um éster. Com um álcool, como o metanol, o lipídio é conjugado a um grupo metila, produzindo um éster de ácido graxo apolar que normalmente é preferível como um combustível de transporte. Para limitar a exposição da lipase aos lipídios das microalgas até que as condições estejam adequadas para transesterificação para a produção de ésteres de ácidos graxos, a lipase pode ser expressa, por exemplo, no cloroplasto, na mitocôndria, ou outra organela celular. Esta expressão compartimentalizada resulta no seqüestro da lipase da maioria dos lipídeos celulares até depois de as células terem sido rompidas.

Em outra modalidade particular, o presente pedido descreve cepas geneticamente modificadas de microalgas, de leveduras oleaginosas, de bactérias ou de fungos com um ou mais genes exógenos para produzir vários compostos de hidrocarbonetos. Por exemplo, as microalgas que naturalmente, ou através da modificação genética, produzem altos níveis de lipídios, podem ser modificadas (ou mais modificadas) para expressar uma tioesterase de

acil-ACP graxo exógena, o que pode facilitar a clivagem de ácidos graxos da proteína transportadora de acila (ACP), durante a síntese de lipídios. Esses ácidos graxos podem ser recuperados ou, através de outro processamento enzimático dentro da célula, produzir outros compostos de hidrocarbonetos. Opcionalmente, a tioesterase de acil-ACP graxo pode ser expressa a partir de um gene ligado operacionalmente a um promotor induzível, e/ou pode ser expressa em um compartimento intracelular.

A tioesterase de acil-ACP graxo pode ser escolhida com base na sua especificidade para um crescimento (durante a síntese de ácidos graxos) de ácidos graxos com um comprimento de cadeia de carbono específico. Por exemplo, a tioesterase de acil-ACP graxo pode ter uma especificidade para um comprimento de cadeia de carbono variando de 8 a 34 átomos de carbono, de preferência de 8 a 18 átomos de carbono, e mais preferencialmente de 10 a 14 átomos de carbono. A especificidade de um ácido graxo com 12 átomos de carbono é a mais preferível.

Além disso, a invenção fornece cepas geneticamente modificadas de microalgas para expressar dois ou mais genes exógenos, como, por exemplo, um gene de lipase e um lítico, por exemplo, um que codifica uma enzima degradante de polissacarídeos. Um ou ambos os genes podem ser expressos usando um promotor induzível, que permitem que o sincronismo relativo de expressão desses genes deve ser controlado para aumentar a produção de lipídios e a conversão em ésteres de ácidos graxos. A invenção também fornece vetores e métodos para micróbios produtores de lipídios modificados metabolizarem a sacarose, que é uma característica vantajosa, pois permite às células modificadas converterem açúcar de cana ou outras matérias-primas em lipídios adequados para produção de óleos, combustíveis, óleos químicos e similares.

Em outras modalidades, a invenção fornece cepas modificadas de micróbios (por exemplo, microalgas, levedura oleaginosa, bactérias ou fungos), que expressam dois ou mais genes exógenos, como, por exemplo, uma tioesterase de acil-ACP graxo e um acil-CoA graxo/aldeído redutase, cuja ação combinada produz um álcool. A invenção prevê ainda outras combinações de genes exógenos, incluindo, entre outras, uma tioesterase de acil-ACP graxo e uma proteína transportadora de acila co-expressa naturalmente para gerar ácidos graxos de comprimento específico, ou uma tioesterase de acil-ACP graxo e uma redutase de acil-CoA graxo para gerar aldeídos. A invenção também prevê a combinação de uma tioesterase de acil-ACP graxo, uma redutase de acil-CoA graxo, e um aldeído decarbonilase graxo para gerar alcanos ou alcenos. Um ou mais dos genes exógenos pode ser expressos através de um promotor induzível.

A invenção fornece outras modificações de microalgas, por exemplo, para fornecer microalgas com características de crescimento desejadas e/ou para aumentar a quantidade

e/ou a qualidade dos lipídios produzidos. Por exemplo, as microalgas podem ser modificadas para aumentar o fluxo de carbono na via lipídica e/ou modificar o caminho lipídico para alterar beneficamente as proporções ou propriedades dos lipídios produzidos pelas células.

Este pedido revela cepas geneticamente modificadas de microalgas para expressar dois ou mais genes exógenos, um codificando um transportador de uma fonte de carbono fixa (como a sacarose), e um segund codificando uma enzima sacarose invertase. Os organismos fermentáveis resultantes produzem hidrocarbonetos em menor custo de produção do que o que foi obtido por métodos previamente conhecidos de produção biológica de hidrocarbonetos. A inserção dos dois genes exógenos descritos acima pode ser combinada com a interrupção da biossíntese de polissacarídeos através de mutagênese direta e/ou aleatória, que dirige fluxo de carbono ainda maior na produção de hidrocarbonetos. Individualmente e em combinação, a conversão trófica, a engenharia para alterar a produção de hidrocarbonetos e o tratamento com enzimas exógenas alteram a composição de hidrocarbonetos produzidos por um microorganismo. A alteração pode ser uma mudança na quantidade de hidrocarbonetos produzidos, an quantidade de uma ou mais espécies de hidrocarbonetos produzida em relação a outros hidrocarbonetos, e/ou nos tipos de espécies de hidrocarbonetos produzidos no microorganismo. Por exemplo, as microalgas podem ser projetadas para produzir uma maior quantidade e/ou percentagem de TAGs.

III. MICROORGANISMOS PRODUTORES DE ÓLEO OU LIPÍDIOS

Qualquer espécie de organismo que produz lipídios ou hidrocarbonetos adequados pode ser utilizada, embora os microorganismos que produzem naturalmente altos níveis de lipídios ou hidrocarbonetos adequados sejam preferidos. A produção de hidrocarbonetos por microorganismos é revisada por Metzger et al. Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66: 486–496 and A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann and Paul Roessler (1998).

Considerações sobre a seleção de microorganismos para uso na invenção incluem, além da produção de lipídios ou hidrocarbonetos adequados para a produção de óleos, combustíveis e óleos químicos: (1) elevado teor de lipídos em percentagem de peso celular; (2) facilidade de crescimento, (3) facilidade de engenharia genética, e (4) facilidade de processamento de biomassa. Em modalidades particulares, o tipo selvagem ou geneticamente modificado de microorganismos produzem células que são pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, no mínimo, 65%, ou, pelo menos70% ou mais lipídicas. Organismos preferidos crescer heterotrofico

(em açúcares na ausência de luz) ou podem ser projetados para fazê-lo usando, por exemplo, os métodos aqui divulgados. A facilidade de transformação e a disponibilidade de marcadores e promotores selecionáveis, constitutivos e/ou induzíveis, que são funcionais no microorganismo, afetam a facilidade de engenharia genética. O processamento de considerações de pode incluir, por exemplo, a disponibilidade de meios eficazes para lisar as células.

A. <u>Algas</u>

Em uma modalidade da presente invenção, o microrganismo é uma microalga. Exemplos não limitantes de microalgas que podem ser usados em conformidade com a presente invenção podem ser encontrados na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de microalgas.

Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis linea, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Bracteococcus minor, Bracteococcus medionucleatus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsulate, Chlorella desiccate, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora (strain SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella ovalis, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (incluindo qualquer cepa de UTEX 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiglii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Crypthecodinium cohnii, Cryptomonas sp., Cyclotella

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

1. ***Chlorella***

Em uma modalidade preferida da presente invenção, o microorganismo é do gênero Chlorella, de preferência , Chlorella protothecoides , Chlorella ellipsoidea, Chlorella minutissima, ou Chlorella emersonii .

Chlorella é um gênero de algas verdes unicelulares, pertencentes ao filo Chlorophyta. É de forma esférica, de 2 a 10 µm de diâmetro, e é sem flagelos. Algumas espécies de *Chlorella* são naturalmente heterotróficas.

Chlorella, particularmente a *Chlorella protothecoides*, é um microorganismo preferido para o uso na invenção, devido à sua elevada composição de lipídios, principalmente lipídios de cadeia longa adequados para o biodiesel. Além disso, esta microalga cresce heterotroficamente e pode ser geneticamente modificada como demonstrado nos exemplos mencionados.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, o microorganismo usado para a expressão de um transgene é do gênero *Chlorella*, de preferência, *Chlorella*

protothecoides, *Chlorella minutissima*, ou *Chlorella emersonii*. Exemplos de expressão de transgenes, por exemplo, na *Chlorella*, podem ser encontrados na literatura (ver, por exemplo *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 Pathology*. J 21 (1): 13-20, (2005)). Veja também exemplos aqui. Outras microalgas produtoras de lipídios podem ser também modificadas, incluindo as microalgas procariotas (ver Kalscheuer al ST. Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 52, Number 4 / October, 1999).

2. Identificação da *Espécie* Chlorella

Espécies de *Chlorella* para uso na invenção podem ser identificadas pela amplificação de certas regiões-alvo do genoma. Por exemplo, a identificação de uma espécie ou cepa específica de *Chlorella* pode ser alcançada através de amplificação e seqüenciamento de materiais nucleares e/ou DNA do cloroplasto, usando primers e metodologia de utilização de qualquer região do genoma, por exemplo, utilizando os métodos descritos no Wu et *al.*, *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2001) 42:115-121 Identification of *Chlorella spp.* isolates using ribosomal DNA sequences. Métodos bem estabelecidos de análise filogenética, como a amplificação e seqüenciamento do espaçador interno transcrito ribossomal (ITS1 e ITS2 rDNA), 18S rRNA, e outras regiões genômicas conservadas podem ser usados pelos peritos em identificar espécies, não só Chlorella, mas outros organismos produtores de hidrocarbonetos e lipídios capazes de usar os métodos aqui divulgados. Para exemplos de métodos de identificação e classificação de algas veja também, por exemplo, *Genetics*, 2005 Aug;170(4):1601-10 and *RNA*, 2005 Apr;11(4):361-4.

B. <u>Leveduras Oleaginosas</u>

Em uma modalidade da presente invenção, o microrganismo é uma levedura oleaginosa. Exemplos não limitantes de leveduras oleaginosas que podem ser usados em conformidade com a presente invenção podem ser encontrados na Tabela 2.

Tabela 2. Exemplos de leveduras oleaginosas.

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

C. <u>Outros Fungos</u>

Em uma modalidade da presente invenção, o microrganismo é um fungo. Exemplos

não limitantes de fungos que podem ser usados em conformidade com a presente invenção podem ser encontrados na Tabela 3.

Tabela 3. Exemplos de fungos.

Mortierella, Mortierria vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Penicillium illacinum, Hensenula, Chaetomium, Cladosporium, Malbranchea, Rhizopus, and *Pythium*

D. Bactérias

Em uma modalidade da presente invenção, o microrganismo é uma bactéria.

Exemplos de expressão de genes exógenos em bactérias, como a E. *coli*, são bem conhecidos; ver, por exemplo *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al.* (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press).

IV MÉTODOS DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Os microrganisms são cultivados tanto para fins de realização de manipulações genéticas quanto para a subsequente produção de hidrocarbonetos (por exemplo, lipídios, ácidos graxos, aldeídos, álcoois e alcanos). O primeiro tipo de cultura é realizado em pequena escala e, inicialmente, pelo menos, nas condições em que o microrganismo pode começar a crescer. Por exemplo, se o microrganismo de partida é um fotoautótrofo, a cultura inicial é feita na presença de luz. As condições de cultura podem ser alteradas se o microrganismo é desenvolvido ou projetado para crescer independentemente da luz. A cultura para fins de produção de hidrocarbonetos é geralmente conduzida em larga escala. De preferência, uma fonte de carbono fixa está presente. A cultura também pode ser exposta à luz por algum ou todo o tempo.

As microalgas podem ser cultivadas em meios líquidos. A cultura pode ser contida dentro de um biorreator. Opcionalmente, o biorreator não permite a entrada de luz. Alternativamente, as microalgas também podem ser cultivadas em fotobiorreatores que contêm uma fonte de carbono fixa e permitem que a luz ataque as células. A exposição de células de microalgas à luz, mesmo na presença de uma fonte de carbono fixa que as células transportam e utilizam (isto é, crescimento mixotrófico), contudo, acelera o crescimento em relação ao cultivo de células no escuro. Os parâmetros de condição de cultura podem ser manipulados para otimizar a produção total de hidrocarbonetos, a combinação de espécies de hidrocarbonetos produzidos, e/ou a produção de uma espécie de hidrocarboneto. Em alguns casos é preferível cultivar as células no escuro como, por exemplo, quando fermentadores extremamente grandes (40.000 litros e maiores) são usados, não permitindo que a luz atinja a cultura.

Os meios de cultura de microalgas normalmente contêm componentes como uma

fonte de nitrogênio fixas, elementos traços, opcionalmente um tampão para a manutenção do pH, e fosfato. Outros componentes podem incluir uma fonte de carbono fixa, tais como acetato ou glicose e sais, como cloreto de sódio, principalmente para microalgas marinhas. Exemplos de elementos traços incluem zinco, boro, cobalto, cobre, manganês e molibdênio, por exemplo, nas respectivas fórmulas de $ZnCl_2$, H_3BO_3, $CoCl_26H_2O$, $CuCl_2»2H_2O$, $MnCl_2» 4H_2O$ e $(NH_4)_6Mo_7O_{24}»4H_2O$.

Para organismos capazes de crescer em uma fonte de carbono fixa, a fonte de carbono fixa podem ser, por exemplo, glicose, frutose, sacarose, galactose, xilose, manose, ramnose, N-acetilglicosamina, glicerol, floridosídeo, e/ou ácido glucurônico . Uma ou mais fontea de carbono podem ser fornecidas em uma concentração de pelo menos cerca de 50 □M, pelo menos cerca de 100 □M, pelo menos cerca de 500 □M, pelo menos cerca 5 mM, pelo menos cerca de 50 mM, e pelo menos cerca de 500 mM, de uma ou mais fonte de carbono fixa exogenamente fornecida. Algumas espécies de microalgas podem crescer utilizando uma fonte de carbono fixa, como a glicose ou o acetato, na ausência de luz. Tal crescimento é conhecido como crescimento heterotrófico. Para a *Chlorella protothecoides*, por exemplo, crescimento heterotrófico resulta em alta produção de biomassa e acúmulo de elevado teor de lípidos nas células.

Alguns microrganismos crescem naturalmente ou podem ser modificados para crescer em uma fonte de carbono fixa que é uma fonte heterogênea de compostos como os resíduos urbanos, esgoto secundariamente tratado, águas residuais e outras fontes de carbono fixa e outros nutrientes, como sulfatos, fosfatos e nitratos. O componente de esgoto serve como fonte de nutrientes na produção de hidrocarbonetos, e a cultura fornece uma fonte barata de hidrocarbonetos.

Outros parâmetros de cultura também podem ser manipulados, como o pH do meio de cultura, a identidade e a concentração de elementos traços e outros constituintes do meio.

A. <u>Crescimento Fotosintético</u>

As microalgas podem ser cultivadas na presença de luz. O número de fótons marcantes de uma cultura de células de microalgas pode ser manipulado, bem como outros parâmetros, como o espectro de comprimento de onda e o proporção horas no escuro por dia. As microalgas podem ser cultivadas na luz natural, bem como em combinações simultâneas e/ou alternadas de luz natural e luz artificial. Por exemplo, as microalgas do gênero *Chlorella* podem ser cultivadas sob luz natural durante o dia e sob luz artificial durante a noite.

O teor de gás de um fotobiorreator para o crescimento de microrganismos como microalgas pode ser manipulado. Parte do volume de um fotobiorreator pode conter gás,

em vez de líquido. As entradas de gás podem ser usadas para bombear gases no fotobiorreator. Qualquer gás pode ser bombeado para um fotobiorreator, incluindo ar, misturas de ar/CO_2, gases nobres como argônio e outros. A taxa de entrada de gás em um fotobiorreator também pode ser manipulada. O aumento do fluxo de gás em um fotobiorreator aumenta a turbidez de uma cultura de microalgas. A colocação de aberturas de transporte de gases em um fotobiorreator também pode afetar a turbidez de uma cultura em uma determinada taxa de fluxo de gás. As misturas de ar/CO_2 podem ser moduladas para gerar quantidades ideais de CO_2 para o crescimento máximo de um organismo específico. As microalgas crescem significativamente mais rápido na luz sob, por exemplo, 3% de CO_2/97% de ar do que em 100% de ar. 3% CO_2/ 97% de ar tem aproximadamente 100 vezes mais CO $2_{\text{do que}}$ o encontrado no ar. Por exemplo, ar: misturas de CO_2 de cerca de 99,75% ar: 0,25% de CO_2, cerca de 99,5% ar: 0,5% de CO_2, cerca de 99,0% ar: 1,00% de CO_2, cerca de 98,0% ar: 2,0% de CO_2, cerca de 97,0% ar: 3,0% de CO_2, cerca de 96,0% ar: 4,0% de CO_2, e cerca de 95,00% ar: 5,0% de CO_2 podem ser infundidos em um biorreator ou fotobiorreator.

As culturas de microalgas também podem ser submetidas a misturação usando aparelhos como lâminas e impulsores giratório, balanço de uma cultura, barras de agitação, infusão de gás pressurizado, e outros instrumentos.

Os fotobiorreatores podem ter aberturas permitindo a entrada de gases, sólidos, semi-sólidos e líquidos para dentro da câmara que contém as microalgas. As aberturas estão geralmente ligadas à tubulação ou outros meios de transportar substâncias. As aberturas de gás transportam, por exemplo, gases para dentro da cultura. O bombeamento de gases em um fotobiorreator pode servir tanto para alimentar células com $_{CO\ 2}$ e com outros gases quanto para arejar a cultura e, portanto, gerar turbidez. A quantidade de turbidez de uma cultura varia conforme o número e a posição das aberturas de gás são alterados. Por exemplo, as aberturas de gás podem ser colocadas ao longo do fundo de um saco de polietileno cilíndrico. As microalgas crescem mais rapidamente quando$_{CO\ 2}$ é adicionado ao ar e borbulhado em um fotobiorreator. Por exemplo, 5% de CO_2: 95% de mistura de ar é injetado em um fotobiorreator contendo células de *Botryococcus* (ver, por exemplo J Agric Food Chem. 2006 Jun 28;54(13):4593-9; J Biosci Bioeng. 1999; 87 (6) :811-5, e J Nat Prod. 2003 Jun;66(6):772-8).

Os fotobiorreatores podem ser expostos a uma ou mais fontes de luz para fornecer microalgas com a luz como fonte de energia através de luz direcionada para uma superfície do fotobiorreator. De preferência, a fonte de luz fornece uma intensidade que é suficiente para as células crescerem, mas não tão intensa para causar dano oxidativo ou provocar uma resposta fotoinibidora. Em alguns casos, uma fonte de luz tem um alcance de comprimento

de onda que imita ou aproximadamente imita o alcance do sol. Em outros casos, um alcance de comprimento de onda diferente é utilizado. Os fotobiorreatores podem ser colocados ao ar livre ou em estufa ou outra instalação que permita que a luz solar atinja a superfície. As intensidades de fóton preferidos para as espécies do gênero *Botryococcus* têm entre 25 e 500 m $\mu E^{-2} s^{-1}$ (ver, por exemplo Photosynth Res. 2005 Jun;84(1-3):21-7).

Os fotobioereatores têm, preferencialmente, uma ou mais aberturas que permitem a entrada de meio. Não é necessário que apenas uma substância entre ou saia de uma abertura. Por exemplo, uma abertura pode ser utilizada para escoar meios de cultura para o fotobiorreator e depois pode ser utilizada para amostragem, entrada do gás, saída de gás, ou para outros fins. Em alguns casos um fotobiorreator está cheio de meios de cultura no início de uma cultura, e não é administrado mais meio de crescimento após a cultura ser inoculada. Em outras palavras, a biomassa de microalgas é cultivada em um meio aquoso por um período de tempo durante o qual as microalgas reproduzem e aumentam em número; contudo, as quantidades de meio de cultura aquoso não são escoadas através do fotobiorreator durante todo o período de tempo. Assim, em algumas modalidades, o meio de cultura aquoso não é escoado através do fotobiorreator após a inoculação.

Em outras situações, o meio de cultura pode ser escoado pelo fotobiorreator durante todo o período de tempo no qual as microalgas reproduzem e aumentam em número. Em algumas modalidades, o meio é infundido no fotobiorreator após a inoculação, mas antes de as células chegarem a uma densidade desejada. Em outras palavras, um regime de fluxo turbulento de entrada de gás e entrada de meio não é mantido para a reprodução de microalgas, até um aumento desejado no número das referidas microalgas ser atingido.

Os fotobiorreatores têm, preferencialmente, uma ou mais aberturas que permitem a entrada de gás. O gás pode servir tanto para fornecer nutrientes tais como o CO_2, quanto para fornecer turbulência aos meios de cultura. A turbulência pode ser alcançada pela colocação de uma abertura de entrada do gás abaixo do nível dos meios de cultura aquosos, de modo que a entrada de gás no fotobiorreator borbulha até superfície da cultura. Uma ou mais aberturas de saída de gás permitem que o gás escape, evitando o acúmulo de pressão no fotobiorreator. De preferência, uma abertura de saída de gás leva a uma válvula unidirecional que impede a contaminação por microrganismos de entrar no fotobiorreator. Em alguns casos, as células são cultivadas em um fotobiorreator por um período de tempo durante o qual as microalgas reproduzem e aumentam em número; no entanto, um regime de fluxo turbulento, com redemoinhos turbulentos predominantemente em todo o meio de cultura causados pela entrada de gás, não é mantido durante todo o período de tempo. Em outros casos, um regime de fluxo turbulento, com redemoinhos turbulentos predominantemente em todo o meio de cultura causados pela entrada de gás, pode ser

mantido durante todo o período de tempo no qual as microalgas reproduzem e aumentam em número. Em alguns casos, um intervalo pré-determinado de proporções entre a dimensão do fotobiorreator e a escala dos redemoinhos não é mantido pelo período de tempo no qual as microalgas reproduzem e aumentam em número. Em outros casos, tal intervalo pode ser mantido.

Os fotobiorreatores de preferência têm pelo menos uma abertura que pode ser utilizada para a amostragem da cultura. De preferência, uma abertura de amostragem pode ser usada repetidamente sem alterar o comprometimento da natureza axênica da cultura. Uma abertura de amostragem pode ser configurada com uma válvula ou outro dispositivo que permite que o fluxo de amostra seja interrompido e iniciado. Alternativamente, uma abertura de amostragem pode permitir a amostragem contínua. Os fotobiorreatores de preferência têm pelo menos uma abertura que permite a inoculação de uma cultura. Essa abertura pode também ser utilizada para outros fins, como meios ou a entrada de gás.

B. <u>Crescimento Heterotrófico</u>

Como uma alternativa para o crescimento fotossintético de microorganismos, como descrito acima, alguns microrganismos podem ser cultivados em condições heterotróficas de crescimento em que uma fonte de carbono fixa fornece energia para o crescimento e o acúmulo de lipídios.

Em um método de cultivo heterotrófico, de acordo com a invenção, o custo de produção de biodiesel, glicerol bruto, parcialmente purificado ou purificado produzido como um subproduto da transesterificação lipídica pode ser empregado como matéria-prima para a fermentação de, por exemplo, culturas microbianas de produção de lipídios. Assim, a invenção compreende cultivar um micróbio (por exemplo, uma microalga), em uma primeira cultura microbiana; recuperar os lipídios microbianos da cultura; submeter os lipídios microbianos a transesterificação para produzir ésteres de ácidos graxos e glicerol, como descrito acima; e acrescentar o glicerol a uma segunda cultura microbiana como matéria-prima. A primeira e a segunda culturas microbianas podem, mas não precisam, ser culturas do mesmo micróbio. Se desejar, um sistema contínuo pode ser concebido, no qual o glicerol produzido a partir da lipídio recuperado de uma cultura pode ser alimentado de volta para a mesma cultura.

A invenção fornece parâmetros da cultura significativamente melhorados incorporando a utilização de glicerol para a fermentação de vários gêneros tanto de micróbios eucariotas quanto procariotas, incluindo micróbios dos gêneros Chlorella , *Navicula, Scenedesmus, e Spirulina*. Como os exemplos demonstram, micróbios de linhagens evolucionárias extremamente divergentes, incluindo *Chlorella, Navicula, Scenedesmus, e Spirulina* , bem como culturas de várias espécies e cepas distintas de

Chlorella crescem muito bem não só em glicerol de grau reagente purificado, mas também em glicerol acidulado e não acidulado subproduto de transesterificação do biodiesel. Em alguns casos, microalgas como as cepas de *Chlorella* submetem-se mais rapidamente à divisão celular na presença de glicerol do que na presença de glicose. Nesses casos, processos de crescimento de dois estágios, no qual as células são alimentadas primeiro com glicerol para aumentar rapidamente a densidade celular e, em seguida, com glicose para acumular lipídeos, podem melhorar a eficiência com que os lipídios são produzidos. O uso do glicerol subproduto do processo de transesterificação oferece vantagens econômicas significativas quando colocado de volta no processo de produção. Outros métodos de alimentação também são oferecidos, como misturas de glicerol e glicose. A alimentação com tais mistura também tem os mesmos benefícios econômicos. Além disso, a invenção fornece métodos de alimentação alternativa para microalgas com açúcares como a sacarose em várias combinações com glicerol. Estes benefícios proporcionados pela invenção foram demonstrados aqui em micróbios de linhagens evolucionárias extremamente divergentes, incluindo tanto procariotas quanto eucariotas, demonstrando a utilidade da invenção para a fermentação microbiana.

As métodos padrão para o crescimento e propagação de *Chlorella protothecoides* são conhecidos (ver, por exemplo, Miao and Wu,*J. Biotechnology*, 2004, 11:85-93 and Miao and Wu,*Biosource Technology* (2006) 97:841-846). A invenção também fornece novas condições de crescimento para *Chlorella*. Por exemplo, várias espécies de *Chlorella* e múltiplas cepas dentro de uma espécie podem ser cultivadas na presença de glicerol, incluindo glicerol subproduto da transesterificação do biodiesel.

Para a produção de hidrocarbonetos, células, incluindo células recombinantes da invenção aqui descrita, são preferencialmente cultivadas ou fermentados em grandes quantidades. O cultivo pode ser em grandes volumes de líquidos, tais como culturas em suspensão, por exemplo. Outros exemplos incluem começar com uma pequena cultura de células que se expande em uma grande biomassa, combinada com o crescimento e propagação de células, bem como a produção de hidrocarbonetos. Os biorreatores ou fermentadores de aço pode ser usados para acomodar grandes volumes de cultura. Um fermentador semelhante aos utilizados na produção de cerveja e/ou vinho é adequado, assim como os fermentadores extremamente grandes utilizados na produção de etanol.

As fontes de nutrientes adequadas para a cultura num fermentador são fornecidas. Elas incluem matérias-primas como uma ou mais das seguintes: uma fonte de carbono fixa como glicose, amido de milho, material celulósico despolimerizado, sacarose, cana-de-açúcar, açúcar de beterraba, lactose, soro de leite, ou melaço; uma fonte de gordura, como gorduras ou óleos vegetais; uma fonte de nitrogênio como proteína, farelo de soja,

macerado de milho, amônia (puro ou em forma de sal), nitrato ou sal de nitrato, ou nitrogênio molecular; e uma fonte de fósforo como os sais de fosfato. Além disso, um fermentador permite o controle das condições de cultivo, como temperatura, pH, tensão de oxigênio e níveis de dióxido de carbono. Opcionalmente, componentes gasosos, como oxigênio ou nitrogênio, podem ser borbulhados na cultura líquida. Outras fontes de amido (glicose) incluem o trigo, batata, arroz e sorgo. Outras fontes de carbono incluem correntes de processo, como o glicerol de grau técnico, licor negro, ácidos orgânicos, tais como acetato, e melaço. Fontes de carbono também podem ser fornecidas como misturas, tal como uma mistura de sacarose e polpa de açúcar de beterraba despolimerizado.

Um fermentador pode ser usado para permitir que as células se submetam às várias fases do seu ciclo de crescimento. Como exemplo, um inóculo de células produtoras de hidrocarbonetos pode ser introduzido em um meio seguido por um período de latência (fase de latência), antes de as células começarem o crescimento. Após o período de latência, a taxa de crescimento aumenta constantemente e entra na fase log ou exponencial. A fase exponencial por sua vez é seguida por uma desaceleração do crescimento devido à diminuição de nutrientes e/ou aumento de substâncias tóxicas. Após esta desaceleração, o crescimento pára, e as células entram em uma fase estacionária ou estado estacionário, dependendo do ambiente específico fornecido para as células.

A produção de hidrocarbonetos por células aqui divulgada pode ocorrer durante a fase log ou posteriormente, incluindo a fase estacionária, onde os nutrientes são fornecidos, ou ainda disponíveis, para permitir a continuação da produção de hidrocarbonetos na ausência de divisão celular.

Preferencialmente, os microrganismos crescidos nas condições aqui descritas e conhecidas compreendem pelo menos cerca de 20% em peso de lipídios, de preferência pelo menos cerca de 40% em peso, mais preferencialmente pelo menos cerca de 50% em peso, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 60 % em peso.

Uma descoberta surpreendente é que várias espécies, e as múltiplas cepas dentro de uma espécie de *Chlorella* têm melhor desempenho na presença de glicerol subproduto da transesterificação do que em uma quantidade equivalente de glicerol de grau reagente. O glicerol subproduto da transesterificação geralmente contém metanol residual e outros contaminantes, além de glicerol. Por exemplo, as figuras 1a 6 mostram que cepas de *Chlorella protothecoides* e de *Chlorella kessleri* apresentam melhor produtividade em glicerol acidulado e não-acidulado subproduto de reações de transesterificação lipídica do que quando cultivadas em glicerol de grau reagente puro. Outros micróbios, como as microalgas *Scenedesmus* e *Navicula* também podem ter um melhor desempenho na presença de glicerol subproduto da transesterificação do que em uma quantidade

equivalente de glicerol de grau reagente.

Peso Celular Seco por litro: A figura 1 demonstra que o peso celular seco foi maior no biodiesel subproduto de glicerol do que em glicerol puro, e esta tendência era verdade quando as células foram cultivadas em glicerol por si só ou em combinação com a glicose. A figura 2 mostra as mesmas tendências com tensões adicionais de *Chlorella*. A figura 12(b) demonstra que o peso celular seco por litro de *Scenedesmus armatus* é maior em biodiesel subproduto de glicerol acidulado e não acidulado do que em glicerol de grau reagente puro. Figura 13 demonstra que o peso celular seco por litro de *Navicula pelliculosa* é maior sobre biodiesel subproduto de glicerola não acidulado subproduto do biodiesel que em glicerol de grau reagente puro.

Conteúdo Lipídico por litro: As figuras 3 e 4 demonstram que, com várias espécies de *Chlorella* e múltiplas cepas dentro de uma espécie de *Chlorella*, os níveis de lipídeos por litro são mais elevados quando as células são cultivadas na presença de glicerol subproduto do biodiesel do que quando cultivadas na presença das concentrações equivalentes de glicerol de grau reagente puro.

Lipídios como uma Porcentagem de Peso Celular: Figuras 5 e 6 demonstram que várias espécies de *Chlorella* e múltiplas cepas dentro de uma espécie de *Chlorella* acumulam uma maior percentagem de peso celular seco de lipídios, quando cultivadas na presença de glicerol subproduto do biodiesel do que quando cultivadas na presença de concentrações equivalentes de glicerol de grau reagente puro. A figura 11 demonstra que tanto *Spirulina platensis* quanto *Navicula pelliculosa* podem acumular uma maior percentagem de peso celular seco de lipídios, quando cultivadas na presença de glicerol subproduto do biodiesel do que quando cultivadas na presença de concentrações equivalentes de glicerol de grau reagente puro. A figura 12(a) demonstra que *Scenedesmus armatus* pode acumular uma maior percentagem de peso celular seco de lipídios, quando cultivada na presença de glicerol subproduto do biodiesel do que quando cultivada na presença de concentrações equivalentes de glicerol de grau reagente puro.

Outro resultado surpreendente é que várias espécies de micróbios, incluindo as microalgas como *Chlorella* e múltiplas cepas dentro de uma espécie de *Chlorella*, e outras microalgas, tais como *Scenedesmus*, *Naviculae* *Spirulina* apresentam melhores características como produtores de biodiesel na presença de misturas de glicerol e glicose do que na presença apenas de glicose.

Conteúdo Lipídico por litro: A figura 7 demonstra que *Chlorella* pode acumular altos níveis de lipídios por litro de cultura na presença de 1% de glicerol/1% de glicose do que na presença de 2% de glicose.

Peso Celular Seco por litro: A figura 12(b) demonstra que o peso seco de células

por litro de *Scenedesmus armatus* é maior quando cultivado na presença de 1% de biodiesel subproduto do glicerol/1% de glicose do que na presença de 2% de glicose. A figura 13 demonstra que o peso seco de células por litro de *Navicula pelliculosa* é maior quando cultivado na presença de 1% de biodiesel subproduto do glicerol/1% de glicose do que na presença de 2% de glicose.

Lipídios como uma Porcentagem de Peso Celular: A figura 8 demonstra que *Chlorella* pode acumular uma maior percentagem de peso seco de lipídios quando cultivada na presença de uma mistura de concentração igual (por cento em peso) de glicerol e glicose do que quando cultivada na presença apenas de glicose. A figura 11(a) demonstra que Spirulina platensis pode acumular uma maior percentagem de peso celular seco de lipídios, quando cultivada na presença de uma mistura de concentração igual (por cento em peso) de biodiesel subproduto do glicerol e glicose do que quando cultivada na presença apenas de glicose. A figura 11(b) demonstra que Navicula pelliculosa pode acumular uma maior percentagem de peso celular seco de lipídios, quando cultivada na presença de uma mistura de concentração igual (por cento em peso) de glicerol de grau reagente e glicose, assim como biodiesel subproduto do glicerol, do que quando cultivadas na presença apenas de glicose. A figura 12(b) demonstra que Scenedesmus armatus pode acumular uma maior percentagem de peso celular seco de lipídios, quando cultivada na presença de uma mistura de concentração igual (por cento em peso) de biodiesel subproduto do glicerol e glicose do que quando cultivada na presença apenas de glicose.

Uma descoberta adicional e inesperada é que a adição de glicerol e glicose para os micróbios, incluindo as microalgas como *Chlorella, Scenedesmuse Navicula* seqüencialmente ao invés de em um único lote de mistura de glicerol e glicose pode gerar ganhos de rendimento adicionais. Este atributo de múltiplas espécies de *Chlorella* e múltiplas cepas dentro de uma espécie de *Chlorella* foi testada na presença do biodiesel subproduto do glicerol e glicerol de grau reagente.

Lipídios como uma Porcentagem de Peso Celular: A figura 8 demonstra que *Chlorella* pode acumular uma maior percentagem de peso seco de lipídios, quando glicerol é adicionado a uma cultura por um primeiro período de tempo, seguido da adição de glicose e a cultura contínua por um segundo período de tempo, do que quando as mesmas quantidades de glicerol e glicose são adicionadas no início do experimento.

Conteúdo Lipídico por litro: A figura 9 mostra *Chlorella* apresentando níveis mais elevados de lipídios por litro de cultura quando glicerol e glicose são adicionadas seqüencialmente do que quando as mesmas quantidades de glicerol e glicose são adicionadas no início do experimento. Esta tendência foi observada quando o biodiesel subproduto do glicerol acidulado, o biodiesel subproduto do glicerol não acidulado, ou o

glicerol de grau reagente foi usado.

Peso Celular Seco por litro: A figura 10 demonstra quatro diferentes linhagens de *Chlorella* de duas espécies diferentes acumulando maior peso seco de células por litro de cultura quando glicerol e glicose são adicionadas seqüencialmente do que quando as mesmas quantidades de glicerol e glicose são adicionadas no início do experimento. Esta tendência foi observada quando biodiesel subproduto do glicerol acidulado, biodiesel subproduto do glicerol não acidulado, ou glicerol de grau reagente foi usado. As figuras 14(a) e (b) demonstram que tanto *Scenedesmus armatus* quanto *Navicula pelliculosa* podem apresentar aumento de peso seco de células por litro, quando apenas biodiesel subproduto do glicerol é adicionado a uma cultura por um primeiro período de tempo, seguido mais tarde pela adição de glicose, em comparação com adição de idênticas quantidades de glicerol e glicose no início da fermentação.

Três diferentes marcadores de produtividade (peso seco de células por litro, gramas por litro de lipídios e porcentagem de peso seco de lipídios) na produção de lipídios microbianos são melhorados através da utilização de biodiesel subproduto e da separação temporal de fontes de carbono. A invenção, portanto, fornece novos métodos de produção de maior quantidade de lipídios por unidade de tempo em várias espécies de micróbios em áreas altamente divergentes da árvore evolutiva, incluindo procariotas e eucariotas. Os métodos de fabricação de lipídios e hidrocarbonetos aqui divulgados usando glicerol não estão limitados a microalgas, mas podem ser usados com qualquer micróbio capaz de utilizar o glicerol como fonte de energia.

Em um método alternativo de crescimento heterotrófico em conformidade com a presente invenção, os microrganismos podem ser cultivados usando biomassa celulósica despolimerizada como matéria-prima. A biomassa celulósica (por exemplo, silagens como resíduos de milho) é barata e facilmente disponível, no entanto, as tentativas de usar este material como matéria-prima para a levedura falharam. Em especial, tal matéria-prima foi encontrada para ser inibidora para o crescimento de levedura, e levedura não pode usar o carbono de 5 açúcares produzido a partir de materiais celulósicos (por exemplo, xilose de hemi-celulose). Em contrapartida, as microalgas podem crescer em material celulósico processado. Assim, a invenção fornece um método de cultivo de microalgas na presença de um material celulósico e/ou de carbono de 5 açúcares. Materiais celulósicos em geral, incluem:

Componente	**Porcentagem em Peso seco**
Celulose	40-60%
Hemicelulose	«20-40%
Lignina	10-30%

Materiais celulósicos adequados incluem resíduos de culturas energéticas anuais e perenes, bem como as culturas agrícolas, ou seja, as partes das plantas, principalmente raízes e folhas, não retiradas dos campos como alimento primário ou produto de fibra. Exemplos incluem os resíduos agrícolas, como bagaço de cana, casca de arroz, fibra de milho (incluindo caules, folhas, cascas, e espigas), palha de trigo, palha de arroz, polpa de açúcar de beterraba, polpa cítrica, casca de citrinos; resíduos florestais, como desbastes de madeira dura e macia de operações de madeira; resíduos de madeira, como resíduos de serralheria (cavacos de madeira, serragem) e resíduos de fábrica de celulose, resíduos urbanos, tais como papel de frações de resíduos sólidos urbanos, resíduos de madeira urbanos e resíduos verdes urbanos, tais como a grama municipal e resíduos de construção em madeira. Celulósicos adicionais incluem culturas celulósicas dedicadas, tais como switchgrass, madeira de choupo híbrida, e miscantos, fibra de cana, e fibra de sorgo. Carbonos de 5 açúcares que são produzidos a partir de tais materiais incluem xilose.

Surpreendentemente, algumas espécies de *Chlorella* foram mostradas aqui para apresentar os níveis mais elevados de produtividade quando cultivadas em uma combinação de glicose e xilose do que quando cultivadas apenas em glicose ou xilose. Este efeito sinérgico oferece uma vantagem significativa na medida em que permite o cultivo de *Chlorella* em combinações de xilose e glicose, tais como materiais celulósicos, e é mostrado na figura 15.

Ainda em outro método de crescimento heterotrófico alternativo, em conformidade com a presente invenção, que em si pode, opcionalmente, ser utilizado em combinação com os métodos descritos acima, sacarose produzida por exemplo a partir de cana-de-açúcar ou beterraba, é utilizada como matéria-prima. Conforme descrito em maior detalhe na seção intitulada "Engenharia de Micróbio" abaixo, a produção de lipídios pode ser facilitada ou tornar-se mais eficiente através da engenharia de micróbios como *Chlorella*, para utilizar sacarose como fonte de carbono. Por exemplo expressão, de um transportador de sacarose e sacarose invertase permite a *Chlorella* transportar sacarose para a célula do meio de cultura e hidrolisar sacarose para produzir glicose e frutose. Opcionalmente, um frutoquinase pode ser expressa, bem como nos casos em que a atividade da hexoquinase endógena é insuficiente para a fosforilação máxima de frutose. Exemplos de transportadores de sacarose adequados são GenBank números de adesão CAD91334, CAB92307 e CAA53390. Exemplos de sacarose invertase adequados são Genbank números de adesão CAB95010, NP_012104 e CAA06839. Exemplos de fructokinases adequadas são GenBank números de adesão P26984, P26420 e CAA43322. Vetores de transformação de microalgas, incluindo Chlorella, que codificam um ou mais desses genes

podem ser concebidos como aqui descrito.

A secreção de uma sacarose invertase pode eliminar a necessidade da expressão de um transportador que pode transportar a sacarose dentro da célula. Isso ocorre porque uma invertase secretada catalisa a conversão de uma molécula de sacarose em uma molécula de glicose e uma molécula de frutose, ambas as quais podem ser transportadas e utilizadas pelos micróbios aqui descritos. Por exemplo, a expressão de uma sacarose invertase (como SEQ ID NO: 14) com um sinal de secreção (como o da SEQ ID NO: 15 (a partir de leveduras), SEQ ID NO: 16 (a partir de plantas superiores), SEQ ID NO : 17 (sinal de secreção do consenso eucariótico), e SEQ ID NO: 18 (combinação de seqüência de sinais de plantas superiores e de consenso eucariótico) gera atividade da invertase fora da célula. Veja Hawkins et al. Current Microbiology vol. 38 (1999), pp. 335-341 para exemplos de sinais de secreção ativos em *Chlorella*. A expressão dessa proteína, como possibilitada pela metodologia de engenharia genética descrita aqui, permite que as células já capazes de utilizar a glicose extracelular como uma fonte de energia para utilizar a sacarose como uma fonte de energia extracelular. Em células como *Chlorella protothecoides* , *Chlorella minutissima* e *Chlorella emersonii* que, como demonstrado aqui podem usar tanto a frutose extracelular e glicose extracelular como uma fonte de energia, a secreção de uma invertase pode fornecer a única atividade catalítica necessária para o uso da sacarose como fonte de energia eficiente, barata.

Por exemplo, como mostrado na Figura 26, a *Chlorella protothecoides* pode ser projetada com um gene da sacarose invertase sob o controle regulatório de um dos três promotores (promotor 35S do vírus do mosaico couve-flor (CMV), promotor do vírus Chlorella (CV), ou promotor HUP1 do Chlorella (HUP1)). O gene da sacarose invertase utilizado neste exemplo inclui uma alteração no gene SUC2 do *S. cerevisiae* para otimizar o uso do códon de *C. protothecoides*. As seqüências de cDNA e de aminoácidos do gene otimizado correspondem a SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 19, respectivamente. Uma ilustração dos constructos de plasmídeo usados na transformação é mostrada na Figura 25. A expressão de uma sacarose invertase secretável, como a aqui descrita, permite a utilização de melaços, caldo de cana, e outras matérias-primas contendo sacarose para a fermentação das células.

Da mesma forma, as Figuras 27 e 28 mostram os resultados da transformação de *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima* e *Chlorella emersonii*, respectivamente, com o gene da sacarose invertase do *S. cerevisiae* sob o controle do promotor CMV.

O potencial de crescimento dos microorganismos expressando uma sacarose invertase exógena secretável é ilustrado pela adição de uma invertase ao meio de cultura da *Chlorella protothecoides*, conforme descrito em detalhes nos Exemplos. As Figuras 23 e 24 ilustram o resultado surpreendente que as células de *Chlorella* crescem tão bem em melaço de resíduos do processamento da cana-de-açúcar como na glicose de grau reagente

pura; o uso deste produto de baixo valor de resíduos do processamento da cana-de-açúcar pode fornecer importantes reduções de custos na produção de hidrocarbonetos e de outros óleos. O melaço contém lignina e outros produtos de resíduos celulósicos que envenenam muitos microrganismos e retardam seu crescimento, no entanto, foi descoberto que as células *Chlorella* prosperam na presença de tais venenos. As Figuras 23-24 mostram o crescimento das células em três únicas fontes de melaço (designadas BS1, BS2 e HTM), quando comparado ao crescimento da glicose ou sacarose, na presença ou ausência da sacarose invertase extracelular.

Alternativamente, uma invertase sacarose também pode ser expressa intracelularmente em células que expressam um transportador de sacarose, bem como em células que expressam qualquer transportador de carboidrato que permite que a sacarose entre na célula.

Um gene estrangeiro foi transformado e expresso em *Chlorella protothecoides*, conforme descrito no Exemplo 12. A expressão de genes de utilização de sacarose pode ser realizada utilizando a mesma metodologia ou similar e desenho vetorial.

Biorreatores podem ser empregados para o uso em métodos de crescimento heterotrófico. Como será apreciado, as provisões feitas para tornar a luz disponível para as células em métodos de crescimento fotossintéticos são desnecessárias quando se utiliza uma fonte de carbono fixa nos métodos de crescimento heterotrófico aqui descritos.

Os exemplos específicos das condições de processo e métodos de crescimento heterotrófico aqui descritos podem ser combinados em qualquer forma adequada para melhorar a eficiência de crescimento microbiano e produção de lipídios. Além disso, a invenção inclui a seleção e/ou engenharia genética de micróbios, tais como microalgas, para produzir micróbios que são mais apropriados para o uso nos métodos acima descritos. Por exemplo, os micróbios tendo uma maior capacidade de utilizar qualquer uma das matérias-primas acima descritas para a proliferação aumentada e/ou produção de lipídios (por exemplo, ácidos graxos) estão dentro do escopo da invenção.

C. <u>Crescimento Mixotrófico</u>

O crescimento mixotrófico é o uso tanto da fonte de luz e de carbono fixa como fontes de energia para que as células cresçam e produzam hidrocarbonetos. O crescimento mixotrófico pode ser realizado em um fotobioreator. As microalgas podem ser cultivadas e mantidas em fotobioreatores fechados feitos de diferentes tipos de material transparente ou semitransparente. Tal material pode incluir cercamentos Plexiglass ®, cercamentos de vidro, sacos feitos de substâncias tais como polietileno, tubos transparente ou semitransparente e outros materiais. As microalgas podem ser cultivadas e mantidas em fotobioreactores abertos, tais como tanques "raceway", tanque de colonização, e outros recipientes não fechados.

D. <u>Meio de Crescimento</u>

Os microorganismos úteis, de acordo com os métodos da presente invenção são encontrados em vários locais e ambientes de todo o mundo. Como uma conseqüência de seu isolamento de outras espécies e as suas divergências evolucionárias resultantes, o meio de crescimento particular para o crescimento ótimo e geração de lipídeos e/ou componentes de hidrocarboneto pode ser difícil de prever. Em alguns casos, certas cepas de microorganismos podem ser incapazes de crescer em um meio de crescimento particular devido à presença de algum componente inibitório, ou ausência de alguns requisitos nutricionais essenciais exigidos pela cepa de microorganismos particular.

Os meios de crescimento sólido e líquido estão geralmente disponíveis em uma ampla variedade de fontes, e as instruções para a preparação dos meios partivulares que é adequada para uma grande variedade de cepas de microrganismos podem ser encontradas, por exemplo online, em http://www.utex.org/, um site mantido pela Universidade do Texas em Austin para sua coleção de cultura de algas (UTEX). Por exemplo, vários meios de água doce e água salgada incluem aqueles apresentados na Tabela 4, abaixo.

Tabela 4. Meio de Algas Exemplar.

Meio de Água Doce	Meio de Água Salgada
1/2 CHEV Meio Diatom	1% F/2
1/3 CHEV Meio Diatom	1/2 Meio de Água Marinha Enriquecido
1/5 CHEV Meio Diatom	1/2 Meio Erdschreiber
1:1 DYIII/PEA + Gr+	1/2 Solo + Meio de Água Marinha
2/3 CHEV Meio Diatom	1/3 Solo + Meio de Água Marinha
2X CHEV Meio Diatom	1/4 ERD
Meio Ag Diatom	1/4 Solo + Meio de Água Marinha
Meio Allen	1/5 Solo + Meio de Água Marinha
Meio BG11-1	2/3 Meio de Água Marinha Enriquecido
Meio Bold 1NV	20% Allen + 80 % ERD
Meio Bold 3N	2X Meio de Erdschreiber
Meio Botriococcus	2X Solo + Meio de Água Marinha
Meio Bristol	5% Meio F/2
CHEV Meio Diatom	5/3 Solo + Meio de Agar de Água Marinha
Meio de Chu	Meio de Água Marinha Artificial
CR1 CHEV Meio Diatom	BG11-1 + 30% Meio de NaCl
CR1 + Meio Diatom	BG11-1 + 3% Meio de NaCl
CR1-S Meio Diatom	Bold 1NV:Erdschreiber (1:1)
Meio de Cianídio	Bold 1NV:Erdschreiber (4:1)
Meio de Cianofíceas	Meio Bristol-NaCl
Meio de Desmídio	Meio de Dasicladales de Água Marinha
Meio DYIII	Meio de Água Marinha Enriquecido
Meio de Euglena	Meio de Erdschreiber
Meio HEPES	ES/10 Meio de Água Marinha Enriquecido
Meio J	ES/2 Meio de Água Marinha Enriquecido
Meio de Malte	ES/4 Meio de Água Marinha

	Enriquecido
Meio MES	Meio F/2
Meio Bold 3N Modificado	F/2+NH4
Meio COMBO Modificado	Meio LDM
Meio N/20	2 X CHEV Modificado
Meio de Ocremonas	2 X CHEV Modificado + Solo
Meio P49	Meio de Água Marinha Artificial Modificado
Meio de Pobytomella	CHEV Modificado
Meio de Proteose	Meio de Porfrídio
Meio de Snow Algas	Solo + Meio de Água Marinha
Meio de Extrato do Solo	SS Meio Diatom
Água do solo: Meio BAR	
Água do Solo: Meio GR	
Água do Solo: Meio GR-/NH4	
Água do Solo: GR + Meio	
Água do Solo: Meio GR +/NH4	
Água do Solo: Meio PEA	
Água do Solo: Meio de Turfa	
Água do Solo: Meio VT	
Meio de Spirulina	
Meio Tap	
Meio Trebouxia	
Meio Volvocaceae	
Meio Volvocaceae-3N	
Meio Volvox	
Meio Volvox-Dextrose	
Meio de Waris	
Waris + Meio de Extrato do Solo	

Em um exemplo específico, um meio adequado para o cultivo da *Chlorella protothecoides* (UTEX 31) compreende o Meio de Proteose. Este meio é adequado para culturas axênicas, e um volume de 1L do meio (pH ~6,8) pode ser preparado pela adição de 1g de peptona proteose para 1 litro do Meio Bristol. O meio Bristol compreende 2,94 mM de $NaNO_3$, 0,17 mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,3 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,43 mM, 1,29 mM de KH_2PO_4e 1,43 mM NaCl em uma solução aquosa. Para 1,5% do meio de ágar, 15 g de ágar pode ser adicionada a 1 L da solução. A solução é coberta e autoclavada e então armazenada a uma temperatura refrigerada antes do uso.

Outros meios adequados para uso com os métodos da invenção podem ser facilmente identificados através da consulta da URL acima identificada, ou através da consulta a outras organizações que mantêm culturas de microorganismos, como o SAG, CCAP, ou CCALA. SAG refere-se à Culture Collection of Algae na Universidade de Göttingen (Göttingen, Alemanha), CCAP refere-se à coleção de cultura de algas e protozoários gerida pela Scottish Association for Marine Science (Escócia, Reino Unido), e CCALA refere-se à coleção de cultura do laboratório de algas no Institute of Botany (Třeboň, República Tcheca).

E. <u>Produção Crescente de Lipídeos</u>

As condições do processo podem ser ajustadas para aumentar a produção de lipídios adequados para um determinado uso e/ou para reduzir o custo de produção. Por exemplo, em certas modalidades, um micróbio (por exemplo, uma microalga) é cultivado na presença de uma concentração limitante de um ou mais nutrientes, tais como, por exemplo, carbono e/ou nitrogênio, fósforo ou enxofre, enquanto fornece um excesso da energia de carbono fixo, como a glicose. A limitação por nitrogênio tende a aumentar a produção lipídica microbiana em relação ao rendimento lipídico microbiano em uma cultura em que o nitrogênio é fornecido em excesso. Em modalidades particulares, o aumento na produção de lipídios é de pelo menos cerca de: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, ou 500%. Os micróbios podem ser cultivados na presença de uma quantidade de um nutriente limitante para uma porção do período de cultura total ou por todo o período. Em modalidades particulares, a concentração de nutrientes é ciclada entre uma concentração limitante e uma concentração não-limitante de pelo menos duas vezes durante o período de cultura total.

Para aumentar a produção de lipídios, o ácido acético pode ser empregado na matéria-prima para um micróbio produtor de lipídios (por exemplo, uma microalga). O ácido acético alimenta diretamente o ponto de metabolismo que inicia a síntese de ácidos graxos (ou seja, acetil-CoA), fornecendo assim o ácido acético na cultura que pode aumentar a produção de ácidos graxos. Geralmente, o micróbio é cultivado na presença de uma quantidade suficiente de ácido acético para aumentar a produção lipídica microbiana e/ou produção de ácidos graxos microbiana, especificamente, em relação a produção lipídica microbiana (por exemplo, ácido graxo) na ausência de ácido acético.

Em outra modalidade, a produção de lipídios é aumentada pela cultura de um micróbio produtor de lipídios (por exemplo, microalgas), na presença de um ou mais co-fator(s) de uma enzima de caminho lipídico (por exemplo, uma enzima sintético de ácido graxo). Geralmente, a concentração do cofator(s) é suficiente para aumentar a produção lipídica microbiana (por exemplo, ácidos graxos) em relação a produção lipídica microbiana na ausência de co-fator(s). Em uma modalidade particular, os co-fatores são fornecidos para a cultura, incluindo na cultura um micróbio (por exemplo, microalgas) contendo um gene exógeno que codifica os co-fatores. Alternativamente, os co-fatores poderão ser fornecidos a uma cultura, incluindo um micróbio (por exemplo, microalgas), contendo um gene exógeno que codifica uma proteína que participa na síntese do cofator. Em certas modalidades, cofatores adequados incluem qualquer vitamina exigida por uma enzima de caminho lipídico, como, por exemplo, biotina, pantotenato. Os cofatores de codificação de genes adequados para uso na invenção ou os que participam na síntese de tais cofatores como bem conhecidos e podem ser introduzidos em micróbios (por exemplo, microalgas), usando constructos e técnicas tais como as descritas acima.

V. ENGENHARIA DO CAMINHO LIPÍDICO

Em algumas modalidades da presente invenção, os microorganismos da presente invenção são modificados para alterar as propriedades e/ou proporções de lipídios produzidos e/ou para aumentar o fluxo de carbono em lipídios. O caminho pode ainda, ou, alternativamente, ser modificado para alterar as propriedades e/ou proporções de várias moléculas de hidrocarbonetos produzidas através do processamento enzimático de lipídios.

A. **Alteração das Propriedades ou Proporções de Lipídios ou Hidrocarbonetos Produzidos**

No caso das microalgas, algumas células do tipo selvagem, já tem boas características de crescimento, mas não produzem os tipos ou quantidades de lipídios desejadas. Os exemplos incluem *Pyrobotrys, Phormidium, Agmenellum, Carteria, Lepocinclis, Pyrobotrys, Nitzschia, Lepocinclis, Anabaena, Euglena, Spirogyra, Chlorococcum, tetraedro, Oscillatoria, Phaguse Chlorogonium*, que têm a característica de crescimento desejável do crescimento em esgotos municipais ou águas residuais. Essas células, assim como espécies de *Chlorella* e outros micróbios, podem ser projetadas para ter melhores características de produção de lipídios. As características desejadas incluem a otimização da produção lipídica por unidade de volume e/ou por unidade de tempo, comprimento da cadeia de carbono (por exemplo, para a produção de biodiesel ou para aplicações industriais que requerem matéria-prima de hidrocarbonetos), redução do número de ligações duplas ou triplas, opcionalmente, a zero, remoção ou eliminação dos anéis e estruturas cíclicas, e aumento do hidrogênio: razão de carbono de uma determinada espécie de lipídio ou de uma população de lipídeos distintos. Além disso, as microalgas que produzem hidrocarbonetos adequados também podem ser projetadas para ter saídas de hidrocarbonetos ainda mais desejáveis. Exemplos de tais microalgas incluem espécies do gênero *Chlorella*.

1. Regulação de enzimas que Controlam Pontos de Ramificações na Síntese de Ácidos Graxos

Em modalidades particulares, uma ou mais enzimas-chave que controlam os os pontos de ramificação no metabolismo para a síntese de ácidos graxos podem ser super-reguladas ou sub-reguladas para melhorar a produção de lipídios. A super-regulação pode ser alcançada, por exemplo, pela transformação das células com constructos de expressão nos quais um gene que codifica a enzima de interesse é expresso, por exemplo, usando um promotor forte e/ou elementos intensificadores que aumentam a transcrição. Esses constructos podem incluir um marcador selecionável de modo que os transformantes possam ser submetidos à seleção, o que pode resultar na ampliação do constructo e um aumento no nível de expressão da enzima codificada. Exemplos de enzimas adequadas para a super-regulação de acordo com os métodos da invenção incluem desidrogenase, que desempenha um papel na conversão do piruvato em acetil-CoA (exemplos, algumas das microalgas, incluem números de acesso ao GenBank NP_415392; AAA53047; Q1XDM1 e

CAF05587) . A sobre-regulação do piruvato desidrogenase pode aumentar a produção de acetil-CoA, e assim aumentar a síntese de ácidos graxos. A Acetil-CoA carboxilase catalisa a etapa inicial na síntese de ácidos graxos. Assim, esta enzima pode ser super regulada para aumentar a produção de ácidos graxos (exemplos, algumas das microalgas, incluem números de acesso ao GenBank BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP_537052; YP_536879; NP_045833 e BAA57908). A produção de ácidos graxos também pode ser aumentada pela super-regulação da proteína transportadora de acila (ACP), que carrega as cadeias de acila crescentes durante a síntese de ácidos graxos (exemplos, algumas das microalgas, incluem números de acesso ao GenBank A0T0F8; P51280; NP_849041; YP_874433). O glicerol-3-fosfato aciltransferase catalisa a etapa limitante da taxa da síntese de ácidos graxos. A super-regulação desta enzima pode aumentar a produção de ácidos graxos (exemplos, algumas das microalgas, incluem números de acesso ao GenBank AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857; e ABO94442). As proteínas anteriores são candidatas para a expressão em microalga, incluindo as espécies do gênero *Chlorella*.

A sub-regulação de uma enzima de interesse pode alcançar usando, por exemplo, anti-senso, RNA/DNA catalítica, interferência de RNA (RNAi), "knock-out", "knock-down", ou outras técnicas de mutagênese. A expressão/função da enzima também pode ser inibida com intracorpos. Exemplos de enzimas adequadas para a sub-regulação de acordo com os métodos da invenção incluem a citrato sintase, que consome acetil-CoA como parte do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). A sub-regulação da citrato sintase pode forçar mais acetil-CoA para o caminho sintético de ácidos graxos.

2. Modulação dos Reguladores Globais de Genes Sintéticos de Ácidos Graxos

Os reguladores globais modulam a expressão dos genes dos caminhos biossintéticos de ácidos graxos. Assim, um ou mais reguladores globais da síntese de ácidos graxos podem ser para super ou sub-regulados, conforme o caso, para inibir ou aumentar, respectivamente, a expressão de uma pluralidade de genes sintéticos de ácidos graxos e, finalmente, para aumentar a produção de lipídios. Exemplos incluem proteínas de ligação a elemento regulador de esterol (SREBPs), tais como SREBP-1a e SREBP-1C (para exemplos, ver números de acesso ao Genbank NP_035610 e Q9WTN3). Os reguladores globais podem ser para super ou sub-regulados, por exemplo, como descrito acima no que diz respeito à regulação das enzimas do ponto de controle.

3. Regulação das Enzimas de Modificação de Hidrocarbonetos

Os métodos da invenção também incluem a transformação de células com um ou mais genes que codificam enzimas de modificação de hidrocarbonetos, tais como, por exemplo, uma tioesterase acil-ACP graxa (ver exemplos na Tabela 5 com os números de acesso), um acil-CoA graxa/aldeído redutase (ver exemplos na Tabela 6 com os números

de acesso), uma redutase acil-CoA graxa (ver exemplos na Tabela 7 com os números de acesso), um aldeído decarbonilase graxo (ver exemplos na Tabela 8 com os números de acesso), um aldeído redutase graxo, ou um gene de esqualeno sintase (ver número de acesso ao GenBank AF205791). Em algumas modalidades, os genes que codificam uma tioesterase acil-ACP graxa e uma proteína transportadora de acila co-expressa naturalmente pode ser transformada em uma célula, opcionalmente com um ou mais genes que codificam as outras enzimas de modificação de hidrocarbonetos. Em outras modalidades, o ACP e a tioesterase acil-ACP graxa podem ter uma afinidade para uma outra que dá uma vantagem quando as duas são usadas em conjunto com os micróbios e os métodos da presente invenção, independentemente de se são ou não, naturalmente, co expressas em um tecido específico ou organismo. Assim, a presente invenção contempla tanto os pares naturalmente co-expressos destas enzimas, bem como aqueles que compartilham uma afinidade para interagir um com o outro para facilitar a clivagem de uma cadeia de carbono de comprimento específico do ACP.

Ainda em outras modalidades, uma gene exógeno codificando uma desaturase pode ser transformado em célula em conjunto com um ou mais genes que codificam outras enzimas de modificação de hidrocarbonetos, a fim de proporcionar modificações no que diz respeito à saturação de hidrocarbonetos. A estearoil-ACP desaturase (ver, por exemplo, números de acesso ao GenBank AAF15308; ABM45911 e AAY86086), por exemplo, catalisa a conversão do estearoil-ACP em oleoil-ACP. A super-regulação desse gene pode aumentar a proporção de ácidos graxos monoinsaturados produzidos por uma célula, enquanto a sub-regulação pode reduzir a proporção de monosaturados. Do mesmo modo, a expressão de uma ou mais desaturases glicerolipídicas podem ser controladas para alterar a razão de ácidos graxos insaturados para saturados, como ω-6 desaturase de ácido graxo, ω-3 desaturase de ácido graxo, ou ω-6-oleato desaturase. Em algumas modalidades, a desaturase pode ser seleccionada de acordo com um comprimento da cadeia de carbono desejado, de tal forma que a desaturase seja capaz de fazer modificações específicas no local dentro de um determinado substrato de comprimento de carbono, ou substratos tendo um comprimento de carbono dentro de uma faixa especificada.

Em modalidades particulares, os micróbios da presente invenção são geneticamente modificados para expressar um ou mais genes exógenos selecionados de uma tioesterase acil-ACP graxa, uma acil-CoA graxa/aldeído redutase, uma redutase acil-CoA graxa, um aldeído redutase graxo, um aldeído decarbonilase graxo, ou, uma proteína transportadora de acila co-expressa naturalmente. Os métodos de expressão adequados são descritos acima com relação à expressão de um gene da lipase, incluindo, entre outros métodos, a expressão induzível e a expressão compartimentada.

Sem ter a intenção de ser ligado por qualquer teoria particular ou mecanismo celular, uma tioesterase acil-ACP graxa cliva um ácido graxo a partir de uma proteína

transportadora de acila (ACP), durante a síntese de lipídios. Através da transformação enzimática adicional, o ácido graxo clivado é então combinado com uma coenzima para produzir uma molécula de acil-CoA. Este acil-CoA é o substrato para a atividade enzimática de uma redutase acil-CoA graxa para produzir um aldeído, bem como para uma acil-CoA graxa/aldeído redutase para produzir um álcool. O aldeído produzido pela ação da redutase acil-CoA graxa acima identificado, é o substrato para a atividade enzimática adicional tanto por qualquer um aldeído redutase graxo para produzir um álcool quanto por um aldeído decarbonilase graxo para produzir um alcano ou alqueno.

As enzimas descritas diretamente acima têm uma especificidade para atuar sobre um substrato que inclui um determinado número de átomos de carbono. Por exemplo, uma tioesterase acil-ACP graxa pode ter uma especificidade para a clivagem um ácido graxo com 12 átomos de carbono do ACP. Em algumas modalidades, o ACP e a tioesterase de comprimento específico podem ter uma afinidade para uma outra que as torne particularmente útil como uma combinação (por exemplo, ACP exógeno e os genes de tioesterase podem ser naturalmente co-expressos em um tecido específico ou organismo em que eles são derivados). Por isso, em várias modalidades, o micróbio pode conter um gene que codifica a proteína exógena com uma especificidade para catalisar uma atividade enzimática (por exemplo, a clivagem de um ácido graxo de um ACP, a redução de uma acil-CoA para um aldeído ou um álcool, ou conversão de um aldeído para um alcano) no que diz respeito ao número de átomos de carbono contido no substrato. A especificidade enzimática pode, em várias modalidades, ser para um substrato tendo de 8 a 34 átomos de carbono, preferivelmente de 8 a 18 átomos de carbono, e mais preferivelmente de 10 a 14 átomos de carbono. A especificidade mais preferida é para um substrato tendo 12 átomos de carbono. Em outras modalidades a especificidade pode ser de 20 a 30 átomos de carbono.

Tioesterases de acil-ACP graxas adequadas para uso com os micróbios e os métodos da invenção incluem, sem limitação, aqueles listados na Tabela 5.

Tabela 5. Tioesterase acil-ACP graxas and GenBank accession numbers.

Umbellularia californica tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAC49001)
Cinnamomum camphora tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #Q39473)
Umbellularia californica tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #Q41635)
Myristica fragrans tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAB71729)
Myristica fragrans tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAB71730)
Elaeis guineensis tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #ABD83939)
Elaeis guineensis tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAD42220)
Populus tomentosa tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #ABC47311)
Arabidopsis thaliana tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #NP_172327)
Arabidopsis thaliana tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #CAA85387)
Arabidopsis thaliana tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #CAA85388)
Gossypium hirsutum tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #Q9SQI3)
Cuphea lanceolata tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #CAA54060)

Cuphea hookeriana tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAC72882)
Cuphea calophylla subsp. mesostemon tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #ABB71581)
Cuphea lanceolata tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #CAC19933)
Elaeis guineensis tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAL15645)
Cuphea hookeriana tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #Q39513)
Gossypium hirsutum tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAD01982)
Vitis vinifera tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #CAN81819)
Garcinia mangostana tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAB51525)
Brassica juncea tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #ABI18986)
Madhuca longifolia tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAX51637)
Brassica napus tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #ABH11710)
Oryza sativa (indica cultivar-group) tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #EAY86877)
Oryza sativa (japonica cultivar-group) tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #NP_001068400)
Oryza sativa (indica cultivar-group) tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #EAY99617)
Cuphea hookeriana tioesterase acil-ACP graxa (GenBank #AAC49269)

A acil-CoA graxa/aldeído redutases adequadas para o uso com os micróbios e métodos da invenção incluem, sem limitação, aqueles listados na Tabela 6.

Table 6. acil-CoA graxa/aldeído redutases listadas pelos números de acesso ao GenBank.

AAC45217, YP_047869, BAB85476, YP_001086217, YP_580344, YP_001280274, YP_264583, YP_436109, YP_959769, ZP_01736962, ZP_01980335, ZP_01892096, ZP_01103974, ZP_01915077, YP_924106, YP_130411, ZP_01222731, YP_550815, YP_983712, YP_001019688, YP_524762, YP_856798, ZP_01115500, YP_001141848, NP_336047, NP_216059, YP_882409, YP_706156, YP_001136150, YP_952365, ZP_01221833, YP_130076, NP_567936, AAR88762, ABK28586, NP_197634, CAD30694, NP_001063962, BAD46254, NP_001030809, EAZ10132, EAZ43639, EAZ07989, NP_001062488, CAB88537, NP_001052541, CAH66597, CAE02214, CAH66590, CAB88538, EAZ39844, AAZ06658, CAA68190, CAA52019, e BAC84377

Redutases acil-CoA graxas adequadas para o uso com os micróbios e métodos da invenção incluem, sem limitação, aqueles listados na Tabela 7.

Tabela 7. Redutases acil-CoA graxas listadas pelos números de acesso ao GenBank.

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

Aldeído decarbonilases graxos adequados para o uso com os micróbios e métodos da invenção incluem, sem limitação, aqueles listados na Tabela 8.

Tabela 8. Aldeído decarbonilases graxos listados pelos números de acesso ao GenBank.

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

As combinações de tioesterases acil-ACP graxas co-expressa naturalmente e proteínas transportadoras de acila são adequadas para uso com os micróbios e os métodos da invenção.

Outros exemplos de enzimas de modificação de hidrocarbonetos incluem seqüências de aminoácidos contidas em, referenciadas em, ou codificadas por sequências de ácidos nucléicos contidas ou referenciadas em qualquer uma das seguintes patentes US.: 6.610.527, 6.451.576, 6.429.014, 6.342.380, 6.265.639, 6.194.185, 6.114.160, 6.083.731, 6.043.072, 5.994.114, 5.891.697, 5.871.988, 6.265.639, e descrito em detalhes nos números de acesso ao GenBank: AAO18435; ZP_00513891; Q38710; AAK60613; AAK60610; AAK60611; NP_113747; CAB75874; AAK60612; AAF20201; BAA11024; AF205791 e CAA03710.

Outras enzimas adequadas para o uso com os micróbios e os métodos da invenção incluem aqueles que tem pelo menos 70% de identidade de aminoácido com uma das proteínas listadas nas Tabelas 5-8, e que exibem a atividade enzimática desejada correspondente (por exemplo, clivagem de um ácido graxo a partir de uma proteína transportadora de acila, redução de um acil-CoA para um aldeído ou um álcool, ou a conversão de um aldeído em um alcano). Em modalidades adicionais, a atividade enzimática está presente em uma seqüência que tem, pelo menos, cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos, cerca de 90%, pelo menos, cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade com uma das seqüências acima descritas, todas as quais são incorporadas por referência como se fossem plenamente estabelecidas.

As enzimas de modificação de hidrocarbonetos descritas acima são úteis na produção de vários hidrocarbonetos de um micróbio (por exemplo, uma microalgas, uma levedura oleaginosa, ou um fungo) ou população de micróbios, através da qual uma tioesterase acil-ACP graxa cliva um ácido graxo a partir de uma proteína transportadora de acila (ACP), durante a síntese de lipídios. Através da transformação enzimática adicional, o ácido graxo clivado é então combinado com uma coenzima para produzir uma molécula de acil-CoA. Este acil-CoA é o substrato para a atividade enzimática de uma redutase acil-CoA graxa para produzir um aldeído, bem como para uma acil-CoA graxa/aldeído redutase para produzir um álcool. O aldeído produzido pela ação da redutase acil-CoA graxa acima identificado, é o substrato para a atividade enzimática adicional tanto por qualquer um

aldeído redutase graxo para produzir um álcool quanto por um aldeído decarbonilase graxo para produzir um alcano ou alqueno.

As enzimas de modificação de hidrocarboneto têm uma especificidade para atuar sobre um substrato que inclui um determinado número de átomos de carbono. Por exemplo, uma tioesterase acil-ACP graxa pode ter uma especificidade para a clivagem um ácido graxo com 12 átomos de carbono do ACP. Por isso, em várias modalidades, o micróbio pode conter um gene que codifica a proteína exógena com uma especificidade para catalisar uma atividade enzimática (por exemplo, a clivagem de um ácido graxo de um ACP, a redução de uma acil-CoA para um aldeído ou um álcool, ou conversão de um aldeído para um alcano) no que diz respeito ao número de átomos de carbono contido no substrato. A especificidade enzimática pode, em várias modalidades, ser para um substrato tendo de 8 a 34 átomos de carbono, preferivelmente de 8 a 18 átomos de carbono, e mais preferivelmente de 10 a 14 átomos de carbono. A especificidade mais preferida é para um substrato tendo 12 átomos de carbono. Em outras modalidades a especificidade pode ser de 20 a 30 átomos de carbono.

Em algumas modalidades, os ácidos graxos ou os álcoois primários correspondentes, aldeídos, alcanos ou alquenos, gerados pelos métodos descritos aqui, contém, pelo menos, cerca de 8, pelo menos cerca de 10, pelo menos cerca de 12, pelo menos cerca de 14, pelo menos cerca de 16, pelo menos cerca de 18, pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 22, pelo menos cerca de 24, pelo menos cerca de 26, pelo menos, cerca de 28, pelo menos cerca de 30, pelo menos cerca de 32, ou pelo menos cerca de 34 átomos de carbono ou mais. Os ácidos graxos preferidos para a produção de biodiesel, diesel renovável, ou combustível jato, ou os álcoois primários correspondentes, aldeídos, alcanos e alquenos, para aplicações industriais contém, pelo menos, cerca de 8 átomos de carbono ou mais. Em certas modalidades, os ácidos graxos acima, bem como outras moléculas de hidrocarbonetos correspondentes, estão saturados (sem ligações duplas carbono-carbono ou triplas), mono-insaturados (única ligação dupla); poli insaturados (duas ou mais ligações duplas); são lineares (não cíclicos), e/ou têm pouca ou nenhuma ramificação em suas estruturas.

Pela seleção da combinação desejada dos genes exógenos a serem expressos, pode-se adequar o produto gerado pelo micróbio, que pode então ser extraído a partir da biomassa aquosa. Por exemplo, o micróbio pode conter: (i) um gene exógeno codificando uma tioesterase acil-ACP graxa; e, opcionalmente, (ii) uma proteína transportadora de acila naturalmente co-expressa ou uma proteína transportadora de acila de outra forma tendo afinidade para a tioesterase acil-ACP graxa (ou vice-versa) e , opcionalmente, (iii) um gene exógeno codificando uma acil-CoA graxa/aldeído redutase ou uma redutase acil-CoA graxa, e, opcionalmente, (iv) um gene exógeno codificando um aldeído redutase graxo ou um aldeído decarbonilase graxo. O micróbio, quando cultivada como descrito abaixo,

sintetiza um ácido graxo ligado a uma ACP e a tioesterase acil-ACP graxa catalisa a clivagem do ácido graxo da ACP para produzir, através do processamento enzimático adicional, uma molécula de acil-CoA graxa. Quando presente, a acil-CoA graxa/aldeído reducatase catalisa a redução da acil-CoA para um álcool. Da mesma forma, a redutase acil-CoA graxa, quando presente, catalisa a redução da acil-CoA para um aldeído. Nestas modalidades em que um gene exógeno que codifica uma redutase acil-CoA graxa está presente e expressa para produzir um produto de aldeído, um aldeído redutase graxo, codificada pelo terceiro gene exógeno, catalisa a redução do aldeído para um álcool. Da mesma forma, um aldeído decarbonilase graxo catalisa a conversão do aldeído para um alcano ou um alqueno, quando presente.

Os genes codificando tais enzimas que podem ser obtidos a partir das células já conhecidas para apresentar produção de lipídios significante tais como *Chlorella protothecoides*. Os genes já conhecidos por terem um papel na produção de lipídios, por exemplo, um gene que codifica uma enzima que satura ligações duplas, podem ser transformados individualmente em células recebedoras. Entretanto, para a prática da invenção, não é necessário fazer suposições *a priori* a respeito de que genes são necessários. Uma biblioteca de DNA contendo genes diferentes, tais como cDNAs de um organismo de boa produção de lipídio, podem ser transformados em células recebedoras. O cDNA está preferivelmente em ligação operável com um promotor ativo nas microalgas. Diferentes células de microalgas recebedoras transformadas por uma biblioteca recebem genes diferentes da biblioteca. O transformantes tendo produção de lipídios melhorada são identificados através de métodos de triagem conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, HPLC, cromatografia gasosa e métodos de espectrometria de massa de análise de hidrocarbonetos (para exemplos de tais análises, ver Biomass and Bioenergy Vol. 6. No. 4. pp. 269-274 (1994); Experientia 38; 47-49 (1982); e Phytochemistry 65 (2004) 3159–3165). Estes transformantes são então sujeitos a transformação adicional, com a biblioteca original e/ou, opcionalmente, cruzados para gerar um novo ciclo de organismos com produção lipídica melhorada. Os procedimentos gerais para a evolução de organismos inteiros para adquirir uma propriedade desejada são descritos em, por exemplo, US. 6.716.631. Tais métodos envolvem, por exemplo, a introdução de uma biblioteca de fragmentos de DNA em uma pluralidade de células, segunda a qual pelo menos um dos fragmentos sofre recombinação com um segmento no genoma ou um episome das células para produzir células modificadas. As células modificadas são então triadas para células modificadas que evoluíram para a aquisição da função pretendida. Os vetores e métodos para a transformação são análogos àqueles discutidos em conexão com a expressão des genes de lipase.

Além disso, as bibliotecas subtrativas podem ser usadas para identificar genes cuja transcrição é induzida em condições diferentes, especialmente as condições empregadas no

cultivo de microorganismos para a produção de biodiesel, ou para a produção de hidrocarbonetos úteis como matéria-prima para aplicações industriais. As bibliotecas subtrativas contêm sequências de nucleotídeos refletindo as diferenças entre duas amostras diferentes. Essas bibliotecas são preparadas através de procedimentos que incluem as etapas de desnaturação e hibridização das populações de polinucleotídeos (por exemplo, mRNA, cDNA, seqüências amplificadas) de cada amostra. As seqüências comuns a ambas as amostras hibridizam e são removidas, deixando as seqüências que diferem entre as amostras. Desta forma, as seqüências que são induzidas sob condições especiais podem ser identificadas. Esta técnica pode ser empregada, por exemplo, para identificar os genes úteis para aumentar a produção lipídica (por exemplo, ácidos graxos) e, em particular, a produção de lipídios sob quaisquer condições de cultura desejadas. A técnica de hibridização subtrativa também pode ser empregada para identificar os promotores, por exemplo, os promotores induzíveis, úteis nos constructos de expressão de acordo com a invenção.

Assim, por exemplo, as bibliotecas subtrativas podem ser preparadas a partir de culturas de microrganismos crescidas autotroficamente (à luz, sem uma fonte de carbono fixa) ou heterotroficamente (no escuro, na presença de uma fonte de carbono fixa). Em particular, os genes heterotróficos podem ser induzidos durante o crescimento escuro na presença de uma fonte de carbono fixa e podem, portanto, estar presentes em uma biblioteca geradas subtraindo as seqüências a partir de células autotróficas a partir de seqüências de células heterotróficas escuras. As bibliotecas subtrativas também podem ser preparadas a partir de culturas em que um substrato de carbono particular, tal como a glicose, foi acrescentado para identificar os genes que desempenham um papel no metabolismo do substrato. As bibliotecas subtrativas preparadas a partir de culturas cultivadas na presença de excesso versus nitrogênio limitado podem ser usadas para identificar os genes que controlam a divisão celular, em oposição à produção de acumulação de hidrocarbonetos. A preparação de uma biblioteca subtrativa de uma cultura em que lipídios (por exemplo, ácidos graxos) foram adicionados pode ajudar a identificar os genes cuja super-expressão aumenta a produção de ácidos graxos. Mais especificamente, a adição de ácidos graxos a uma cultura de células que pode utilizar os ácidos graxos adicionados levará à sub-regulação dos genes sintéticos de ácidos graxos para sub-regular a produção de ácidos graxos. A super-expressão de um ou mais genes, terá efeito oposto.

B. <u>Fluxo de Carbono Aumentado em Caminho Lipídico</u>

Algumas microalgas produzem quantidades significativas de metabólitos não-lipídicos, como, por exemplo, polissacarídeos. Porque a biossíntese de polissacarídeos pode utilizar uma proporção significativa da energia metabólica total disponível para as células, a mutagênese das células produtoras de lipídios seguida pela triagem para

produção de polissacarídeos reduzida ou eliminada gera novas cepas que são capazes de produzir maiores rendimentos de lipídios.

O fenol: o ensaio de ácido sulfúrico detecta a carboidratos (ver Hellebust, Handbook of Phycological Methods, Cambridge University Press, 1978; e Cuesta G., et al. J Microbiol Methods. 2003 Jan;52(1):69-73). O ensaio do azul de 1,6 dimetilmetileno detecta os polissacarídeos aniônicos. (ver, por exemplo, Braz J Med Biol Res. 1999 May;32(5):545-50; Clin Chem. 1986 Nov;32(11):2073-6).

Os polissacarídeos também podem ser analisados através de métodos como a HPLC, cromatografia por exclusão de tamanho, e cromatografia de troca aniônica (ver, por exemplo Prosky L, Asp N, Schweizer TF, DeVries JW & Furda I (1988) Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in food and food products: Interlaboratory study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 71, 1017±1023; Int J Biol Macromol. 2003 Nov;33(1-3):9-18). Os polissacarídeos também podem ser detectados usando a eletroforese em gel (ver, por exemplo, Anal Biochem. 2003 Oct 15;321(2):174-82; Anal Biochem. 2002 Jan 1;300(1):53-68).

VI. MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DE LIPÍDEOS E HIDROCARBONETOS

Os hidrocarbonetos (por exemplo, lipídios, ácidos graxos, aldeídos, álcoois e alcanos) produzidos pelas células da invenção podem ser colhidos, ou de outra forma coletados, por qualquer meio conveniente. Por exemplo, os hidrocarbonetos secretados pelas células podem ser centrifugados para separar os hidrocarbonetos em uma camada hidrofóbica de contaminantes em uma camada aquosa e, opcionalmente, a partir de qualquer material sólido como um precipitado, após centrifugação. O material contendo a célula ou frações da célula pode ser tratado com proteases para degradar proteínas contaminantes antes ou após a centrifugação. Em alguns casos, as proteínas contaminantes estão associadas, possivelmente covalentemente, aos hidrocarbonetos ou precursores de hidrocarbonetos que formam os hidrocarbonetos após a remoção da proteína. Em outros casos, as moléculas de hidrocarbonetos estão em uma preparação, que também contém proteínas. As proteases podem ser adicionadas às preparações de hidrocarbonetos contendo proteínas para degradar proteínas (por exemplo, a protease de *Streptomyces griseus* pode ser usada (número de catálogo SigmaAldrich P5147). Após a digestão, os hidrocarbonetos são, preferivelmente purificados a partir das proteínas residuais, fragmentos de peptídeos e aminoácidos. Esta purificação pode ser realizada, por exemplo, pelos métodos listados acima, como a centrifugação e filtração.

Os hidrocarbonetos extracelulares também podem ser extraídos *in vivo* de células vivas de microalgas, que são, então, retornadas para um biorreator pela exposição das células, em um ambiente de outra forma estéril, a um solvente de extração não-tóxico, seguido pela separação das células vivas e a fração hidrofóbica do solvente de extração e

hidrocarbonetos, no qual as células vivas separadas são em seguida, retornadas para um recipiente de cultura, tal como um fermentador de aço inoxidável ou fotobioreator (ver Biotechnol Bioeng. 2004 Dec 5;88(5):593-600 e Biotechnol Bioeng. 2004 Mar 5;85(5):475-81).

Os hidrocarbonetos também podem ser isolados pela extração da célula inteira. As células são primeiro divididas, como descrito na seção intitulada "Células Lisadas", e então hidrocarbonetos intracelulares e associados a membrana celular/parede celular assim como os hidrocarbonetos extracelulares podem ser coletados a partir da massa de células inteiras, como pela utilização da centrifugação, tal como descrita acima.

Vários métodos estão disponíveis para a separação de hidrocarbonetos e lipídios dos lisados celulares produzidos pelos métodos acima. Por exemplo, os hidrocarbonetos podem ser extraídos com um solvente hidrofóbico, tais como hexano (ver Frenz et al. 1989, Enzyme Microb. Technol., 11:717). Os hidrocarbonetos também podem ser extraídos usando liquefação (ver, por exemplo Sawayama et al. 1999, Biomass and Bioenergy 17:33-39 e Inoue et al. 1993, Biomass Bioenergy 6(4) :269-274); liquefação do petróleo (ver, por exemplo Minowa et al. 1995, Fuel 74 (12):1735-1738) e extração de CO_2 supercrítica (ver, por exemplo, Mendes et al. 2003, Inorganica Chimica Acta 356:328-334).

Miao e Wu descreveram um protocolo de recuperação de lipídios das microalgas, de uma cultura de *Chlorella protothecoides* no qual as células foram colhidas por centrifugação, lavadas com água destilada e secas por liofilização. O pó de célula resultante foi pulverizado em um mortor e, em seguida, extraído com *n*-hexano. Miao and Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846.

A. <u>Lise de Células</u>

Lipídios intracelulares e hidrocarbonetos produzidos no microorganismos são, em algumas modalidades, extraídos após a lise das células do microorganismo. Uma vez extraído, os lipídios e/ou hidrocarbonetos podem ainda ser refinados para produzir óleos, combustíveis ou óleos químicos.

Após a conclusão do cultivo, os microorganismos podem ser separados do caldo de fermentação. Opcionalmente, a separação é efetuada pela centrifugação para gerar uma pasta concentrada. A centrifugação não remove quantidades significativas de água intracelular dos microorganismos e não é uma etapa de secagem. A biomassa pode ser lavada com uma solução de lavagem (por exemplo, água DI) para se livrar do caldo de fermentação e detritos. Opcionalmente, a biomassa microbiana lavado também pode ser seca (seca em forno, liofilizada, etc) antes do rompimento celular. Alternativamente, as células podem ser lisadas sem separação de alguns ou todos os caldo de fermentação, quando a fermentação estiver completa. Por exemplo, as células podem estar em uma

proporção de menos de 1:1 v:v células para o líquido extracelular quando as células são lisadas.

Microorganismos contendo um lipídeo e/ou hidrocarboneto podem ser lisados para produzir um lisado. Como detalhada aqui, a etapa de lise de um microorganismo (também referida por lise celular) pode ser alcançada por qualquer meio conveniente, incluindo a lise induzida pelo calor, adição de uma base, adição de um ácido, uso de enzimas como proteases e enzimas de degradação de polissacarídeos, tais como amilases, uso de ultrasom, lise mecânica, uso do choque osmótico, infecção por um vírus lítico, e/ou expressão de um ou mais genes líticos. A lise é realizada para liberar moléculas intracelulares que foram produzidas pelo microorganismo. Cada um desses métodos para lise de um microrganismo pode ser usado como um método único ou em combinação simultânea ou seqüencialmente.

A extensão da divisão celular pode ser observada pela análise microscópica. Usando um ou mais dos métodos descritos aqui, normalmente mais de 70% da quebra de células é observado. Preferivelmente, a ruptura celular é mais de 80%, mais preferivelmente maior que 90% e mais preferido cerca de 100%.

Em modalidades particulares, o microorganismo é lisado após o crescimento, por exemplo, para aumentar a exposição dos lipídeos celulares e/ou hidrocarbonetos para a extração ou processamento adicional. O momento da expressão da lipase (por exemplo, através de um promotor indutível) ou lise celular pode ser ajustado para otimizar a produção de lipídios e/ou hidrocarbonetos. Abaixo são descritas várias técnicas de lise. Estas técnicas podem ser usadas individualmente ou em combinação.

1. Lise induzida pelo calor

Em uma modalidade preferida da presente invenção, a etapa de lise de um microrganismo compreende o aquecimento de uma suspensão celular contendo o microorganismo. Nesta modalidade, o caldo de fermentação contendo os microorganismos (ou uma suspensão de microrganismos isolados do caldo de fermentação) é aquecido até que os microorganismos, ou seja, as paredes celulares e membranas de microrganismos degradem ou quebrem. Normalmente, as temperaturas aplicadas são pelo menos 50°C. As temperaturas mais elevadas, como, pelo menos, 30°C, pelo menos, 60°C, pelo menos, 70°C, pelo menos, 80°C, pelo menos, 90°C, pelo menos, 100°C, pelo menos 110°C, pelo menos, 120°C, pelo menos 130°C ou mais são usadas para a lise celular mais eficiente.

A lise das células pelo tratamento térmico pode ser realizada através da fervura do microorganismo. Alternativamente, o tratamento térmico (sem ferver) pode ser realizado em um autoclave. O lisado tratado por calor pode ser resfriado para tratamento adicional.

A divisão celular também pode ser realizada por um tratamento com vapor, ou seja, através da adição de vapor pressurizado. O tratamento com vapor de microalgas para a divisão celular é descrito, por exemplo, na Patente US. No. 6.750.048.

2. Lise Usando uma Base

Em outra modalidade preferida da presente invenção, a etapa de lise de um microrganismo compreende a adição de uma base a uma suspensão celular contendo o microorganismo.

A base deve ser forte o suficiente para hidrolisar, pelo menos, uma porção dos compostos protéicos dos microrganismos utilizados. As bases que são úteis para solubilizar as proteínas são conhecidas na técnica da química. Bases exemplar que são úteis nos métodos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos de lítio, sódio, potássio, cálcio e misturas dos mesmos. A base preferida é KOH. O tratamento da base de microalgas para a divisão celular é descrito, por exemplo, na Patente US. No. 6.750.048.

3. Lise Ácida

Em outra modalidade preferida da presente invenção, a etapa de lise de um microrganismo compreende a adição de um ácido a uma suspensão celular contendo o microorganismo. A lise ácida pode ser feita utilizando um ácido em uma concentração de 10-500 mN ou, preferivelmente 40-160 nM. A lise ácida é realizada, preferencialmente, acima da temperatura ambiente (por exemplo, em 40-160°, e preferivelmente, uma temperatura de 50-130°. Para temperaturas moderadas (por exemplo, temperatura ambiente a 100°C e particularmente temperatura ambiente a 65°, o tratamento ácido estar de modo útil combinado com sonicação ou com outros métodos de divisão celular.

4. Lise de Células Usando Enzimas

Em outra modalidade preferida da presente invenção, a etapa de lise de um microrganismo compreende a lise do microorganismo pelo uso de uma enzima. As enzimas preferidas para a lise de um microorganismo são proteases e enzimas de degradação de polissacarídeos, como hemicelulase (por exemplo, hemicelulase de *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #H2125), pectinase (por exemplo, pectinase de *Rhizopus sp.*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #P2401), Mannaway 4.0 L (Novozymes), celulase (por exemplo, celulose de Trichoderma viride; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #C9422), e driselase (por exemplo, driselase de *Basidiomycetes sp.*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #D9515.

a) Celulases

Em uma modalidade preferida da presente invenção, uma celulase para a lise de um microrganismo é uma enzima de degradação de polissacarídeo, opcionalmente de *Chlorella* ou um vírus *Chlorella* .

b) Proteases

As proteases como a protease de Streptomyces griseus, quimotripsina, proteinase K, proteases listadas em Degradation of Polylactide by Commercial Proteases, Oda Yet al., Journal of Polymers and the Environment, Volume 8, Number 1, January 2000 , pp. 29-

32(4), e outras proteases podem ser usadas para a lise de microorganismos. Outras proteases que podem ser usados incluem Alcalase 2,4 FG (Novozymes) e Flavourzima 100 L (Novozymes).

c) Combinações

Qualquer combinação de uma protease e uma enzima de degradação de polissacarídeo também podem ser usada, incluindo qualquer combinação das proteases anteriores e enzimas de degradação de polissacarídeo.

5. Lise de Células Usando Ultra-som

Em outra modalidade preferida da presente invenção, a etapa de lise de um microrganismo é realizada por meio de ultra-som, ou seja, sonicação. Assim, as células também podem ser lisadas com som de alta freqüência. O som pode ser produzido eletronicamente e transportado através de uma ponta metálica para uma suspensão celular devidamente concentrada. Esta sonicação (ou ultra-sonicação) divide a integridade celular baseado na criação de cavidades na suspensão celular.

6. Lise Mecânica

Em outra modalidade preferida da presente invenção, a etapa de lise de um microorganismo é realizada através da lise mecânica. As células podem ser lisadas mecanicamente e, opcionalmente, homogeneizadas para facilitar a coleta de hidrocarboneto (por exemplo, lipídeo). Por exemplo, um disruptor de pressão pode ser usado para bombear uma célula contendo a mistura fraca através de uma válvula de orifício restrita. A alta pressão (até 1500 bar) é aplicada, seguido de uma expansão instantânea através de um bico de saída. O rompimento celular é realizado por três diferentes mecanismos: o choque na válvula, alto cisalhamento líquido no orifício, e queda de pressão repentina mediante descarga, causando uma explosão da célula. O método libera moléculas intracelulares.

Alternativamente, um moinho de esferas pode ser usado. Em um moinho de esferas, as células são agitadas em suspensão com pequenas partículas abrasivas, tais como contas. As células quebram por causa de forças de cisalhamento, moagem entre as contas, e colisões com as contas. As contas dividem as células para liberar os conteúdos celulares. As células também podem ser divididas por forças de cisalhamento, como com o uso da mistura (por exemplo, com uma alta velocidade ou misturador Waring, como exemplos), prensa francesa, ou mesmo centrifugação no caso de paredes celulares fracas, para dividir as células.

7. Lise das Células por Choque Osmótico (Citólise)

Em outra modalidade preferida da presente invenção, a etapa de lise de um microorganismo é realizada através da aplicação de um choque osmótico.

8. Infecção com um Vírus Lítico

Em uma modalidade preferida da presente invenção, a etapa de lise de um microorganismo compreende a infecção do microorganismo com um vírus lítico. Uma

grande variedade de vírus é conhecida por lisar os microrganismos adequados para o uso na presente invenção, e a seleção e utilização de um determinado vírus lítico para um microorganismo particular está dentro do nível de uma pessoa versada na técnica.

Por exemplo, o vírus *paramecium bursaria chlorella* (PBCV-1) é o protótipo de um grupo (família Phycodnaviridae, gênero Chlorovirus) de grandes vírus de DNA de cadeia dupla, grandes, icosaédricos, formadores de placas que replicam dentro, e lisam, certas algas verdes como a chlorella eucariótica, unicelular. Assim, qualquer microalga sensíveis, pode ser lisada pela infecção da cultura com um vírus chlorella adequado. Métodos de infectar espécies de *Chlorella* com um vírus chlorella são conhecidos. Ver, por exemplo *Adv. Virus Res.* 2006;66:293-336; *Virology*, 1999 Apr 25;257(1):15-23; *Virology*, 2004 Jan 5;318(1):214-23; *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2000;(44):161-2; *J. Virol.* 2006 Mar;80(5):2437-44; and *Annu. Rev. Microbiol.* 1999;53:447-94.

9. Autólise (Expressão de um Gene Lítico)

Em outra modalidade preferida da presente invenção, a etapa de lise de um microrganismo compreende a autólise. Nesta modalidade, um microorganismo de acordo com a invenção é geneticamente modificado para produzir uma proteína lítica que lisa o microorganismo. Este gene lítico pode ser expresso através de um promotor induzível de modo que as células possam ser cultivadas primeiro a uma densidade desejável em um fermentador, seguido pela indução do promotor para expressar o gene lítico para lisar as células. Em uma modalidade, o gene lítico codifica uma enzima de degradação de polissacarídeo.

Em algumas outras modalidades, o gene lítico é um gene de um vírus lítico. Assim, por exemplo, um gene lítico de um vírus Chlorella pode ser expresso em uma célula de algas do gênero *Chlorella*, como *C. protothecoides*.

Os métodos de expressão adequados são descritos aqui com relação à expressão de um gene da lipase. A expressão de genes líticos é preferivelmente feita usando um promotor induzível, tal como um promotor ativo em microalgas que é induzida por um estímulo, como a presença de uma pequena molécula, luz, calor e outros estímulos. Os genes líticos do vírus chlorella são conhecidos. Por exemplo, ver *Virology* 260, 308-315 (1999); *FEMS Microbiology Letters* 180 (1999) 45-53; *Virology* 263, 376-387 (1999), e *Virology* 230 , 361-368 (1997).

B. <u>Extração de Lipídios e Hidrocarbonetos</u>

Os lipídeos e hidrocarbonetos produzidos pelos microorganismos da presente invenção podem ser recuperados por extração com um solvente orgânico. Em alguns casos, o solvente orgânico preferencial é hexano. Normalmente, o solvente orgânico é adicionado diretamente ao lisado sem a prévia separação dos componentes do lisado. Em uma modalidade, o lisado gerado por um ou mais dos métodos descritos acima é contatando com um solvente orgânico por um período de tempo suficiente para permitir que os lipídios

e/ou componentes de hidrocarboneto formem uma solução com o solvente orgânico. Em alguns casos, a solução pode ser ainda refinada para recuperar os componentes lipídico desejados específicos e de hidrocarbonetos. Métodos de extração de hexano são bem conhecidas na técnica.

VII. MÉTODOS DE PROCESSAMENTO DE LIPÍDEOS E HIDROCARBONETOS

A. Modificação Enzimática

Hidrocarbonetos (por exemplo, lipídios, ácidos graxos, aldeídos, álcoois e alcanos) produzidos pelas células, como descrito aqui podem ser modificados pelo uso de uma ou várias enzimas, incluindo uma lipase, como descrito acima. Quando os hidrocarbonetos estão no ambiente extracelular das células, uma ou mais enzimas podem ser adicionadas a esse ambiente, sob condições em que a enzima modifica os hidrocarbonetos ou completa sua síntese a partir de um precursor de hidrocarboneto. Alternativamente, os hidrocarbonetos podem ser parcialmente ou completamente isolados do material genético antes da adição de um ou mais catalisadores, tais como enzimas. Tais catalisadores são adicionados exogenamente, e sua atividade ocorre fora da célula ou *in vitro*.

B. Modificação Térmicas e Outras Catalíticas

Hidrocarbonetos produzidos por células *in vivo*, ou enzimaticamente modificados *in vitro*, como descritos aqui, podem ser opcionalmente tratados posteriormente por meios convencionais. O tratamento pode incluir "craqueamento" para reduzir o tamanho, e assim aumentar o hidrogênio: a razão de carbono, de moléculas de hidrocarbonetos. Os métodos de craqueamento térmico e catalítico são usados rotineiramente em hidrocarbonetos e no processamento de óleo de triglicérideos. Métodos catalíticos envolvem o uso de um catalisador, tal como um catalisador de ácido sólido. O catalisador pode ser de sílica-alumina ou um zeólito, que resultam na quebra de uma ligação carbono-carbono heterolítica ou assimétrica para resultar em um carbocátion e um ânion de hidreto. Esses intermediários reativos, em seguida, submetidos ou ao rearranjo ou a transferência de hidreto com outro hidrocarboneto. As reacções podem, assim, regenerar os intermediários para resultar em um mecanismo em cadeia de auto-propagação. Os hidrocarbonetos também podem ser processados para reduzir, opcionalmente a zero, o número de ligações carbono-carbono duplas ou triplas, neste. Os hidrocarbonetos também podem ser processados para remover ou eliminar uma estrutura em anel ou cíclica do mesmo. Os hidrocarbonetos também podem ser processados para aumentar o hidrogênio: razão de carbono. Isso pode incluir a adição de hidrogênio ("hidrogenação") e/ou o "craqueamento" de hidrocarbonetos em hidrocarbonetos menores.

Os métodos térmicos envolvem o uso de temperaturas elevadas e pressão para reduzir o tamanho do hidrocarboneto. Uma temperatura elevada de cerca de 800°C e pressão de cerca de 700kPa podem ser usados. Estas condições geram "luz", um termo que

às vezes é usado para se referir a moléculas de hidrocarbonetos ricas em hidrogênio (como distinguido de fluxo de fótons), enquanto também gera, por condensação, moléculas de hidrocarbonetos mais pesadas que são relativamente empobrecidas de hidrogênio. A metodologia fornece quebra homolítica ou simétrica e produz alquenos, que podem ser opcionalmente enzimaticamente saturados, como descrito acima.

Os métodos térmicos e catalíticos são padrão em instalações para o processamento de hidrocarbonetos e de refino de petróleo. Assim os hidrocarbonetos produzidos por células, como descrito aqui podem ser coletados e processados ou refinados através de meios convencionais. Veja Hillen et al. (Biotechnology and Bioengineering, vol. XXIV:193-205 (1982)) de um relatório sobre hidrocraqueamento de hidrocarbonetos produzidos por microalgas. Em modalidades alternativas, a fração é tratada com outro catalisador, como um composto orgânico, calor e/ou um composto inorgânico. Para o processamento de lipídios em biodiesel, um processo de transesterificação é usado como descrito na Seção IV.

Os hidrocarbonetos produzidos através de métodos da presente invenção são úteis em uma variedade de aplicações industriais. Por exemplo, a produção de sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS), um surfactante aniônico usado em quase todos os tipos de detergentes e preparações para limpeza, utiliza hidrocarbonetos geralmente composto por uma cadeia de 10-14 átomos de carbono. Veja, por exemplo, as Patentes US. Nos 6,946,430; 5,506,201; 6,692,730; 6,268,517; 6,020,509; 6,140,302; 5,080,848; e 5,567,359. Surfactantes, tais como LAS, podem ser usados na fabricação de composições de cuidados pessoais e detergentes, tais como as descritas nas Patentes US. números: 5,942,479; 6,086,903; 5,833,999; 6,468,955; e 6,407,044.

VIII. MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE COMBUSTÍVEIS ADEQUADOS PARA O USO EM TRANSPORTADORS A DIESEL E MOTORES A JATO

Interesse crescente é direcionado para o uso de componentes de hidrocarbonetos de origem biológica em combustíveis, como o biodiesel, diesel renovável e combustível de aviação, já que os materiais de início biológicos renováveis, que podem substituir materiais derivados de combustíveis fósseis estão disponíveis, e sua utilização é desejável. Há uma necessidade urgente por métodos para produzir componentes de hidrocarboneto a partir de materiais biológicos. A presente invenção atende a essa necessidade, fornecendo métodos para a produção de biodiesel, diesel renovável e combustível de aviação usando os lipídeos gerados pelos métodos aqui descritos como um material biológico para produzir biodiesel, diesel renovável e combustível de aviação.

O combustíveis diesel tradicionais são destilados de petróleo ricos em hidrocarbonetos parafínicos. Eles têm de faixas de ebulição tão amplas como 370° a 780°F, que são adequadas para a combustão em motores de ignição por compressão, tais como um transportador com motor a diesel. A Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM),

estabelece o grau de diesel de acordo com a faixa de ebulição, juntamente com escalas permissíveis das propriedades de outros combustíveis, como o número de cetano, ponto de névoa, ponto de fulgor, viscosidade, ponto de anilina, teor de enxofre, teor de água, teor de cinzas, corrosão da tira de cobre, e resíduo de carbono. Tecnicamente, qualquer material destilado de hidrocarboneto derivados da biomassa ou de outra forma que atenda a especificação ASTM adequada pode ser definido como combustível para motores a diesel (ASTM D975), combustível de aviação (ASTM D1655), ou biodiesel (ASTM D6751).

Após a extração, os componentes de lipídios e/ou de hidrocarbonetos extraídos da biomassa microbiana descritos aqui pode ser submetido a tratamento químico para fabricar um combustível para uso em transportadors a diesel e motores a jato.

A. Biodiesel

O biodiesel é um líquido que varia na cor - entre o dourado e marrom escuro - dependendo da matéria-prima de produção. É praticamente imiscível com a água, tem um elevado ponto de ebulição e baixa pressão de vapor. O biodiesel refere-se a um combustível processado equivalente ao diesel para utilização em transportadors com motor a diesel. O biodiesel é biodegradável e não tóxico. Um benefício adicional do biodiesel sobre o combustível diesel convencional é menor desgaste do motor.

Normalmente, o biodiesel é composto de C14-C18 alquil ésteres. Vários processos convertem a biomassa ou de um lipídio produzido e isolado como descrito aqui em combustíveis diesel. Um método preferido para a produção de biodiesel é a transesterificação de lipídios como descrito aqui. Um alquil éster preferido para uso como biodiesel é um éster metílico ou éster etílico.

O biodiesel produzido por um método descrito aqui pode ser usado sozinho ou misturado ao diesel convencional em qualquer concentração em transportadors de motor a diesel mais modernos. Quando misturado ao diesel convencional (diesel de petróleo), o biodiesel pode estar presente em cerca de 0,1% a cerca de 99,9%. Grande parte do mundo usa um sistema conhecido como fator "B" para indicar a quantidade de biodiesel em qualquer mistura de combustível. Por exemplo, o combustível que contém 20% de biodiesel é rotulado B20. O biodiesel puro é denominado B100.

O biodiesel também pode ser usado como combustível de aquecimento em caldeiras domésticas e comerciais. As caldeiras a óleo existentes podem conter partes de borracha e podem requerer a conversão para rodar em biodiesel. O processo de conversão normalmente é relativamente simples, envolvendo a troca das partes de borracha por partes sintéticas devido ao biodiesel ser um solvente forte. Devido a sua forte potência solvente, a queima do biodiesel aumentará a eficiência das caldeiras.

O biodiesel pode ser usado como aditivo em formulações de diesel para aumentar a lubricidade do combustível Diesel com Teor de Enxofre Ultra-reduzido (ULSD), o que é vantajoso, pois não tem praticamente nenhum teor de enxofre.

O biodiesel é um melhor solvente do que o petrodiesel e pode ser utilizado para quebrar os depósitos de resíduos nas linhas de combustível dos transportadores que já foram executados em petrodiesel.

1. Produção de Biodiesel

O biodiesel pode ser produzido pela transesterificação de triglicerídeos contidos na biomassa rica em óleo. Assim, em outro aspecto da presente invenção um método para a produção de biodiesel é fornecido. Em uma modalidade preferida, o método para a produção de biodiesel compreende as etapas de (a) cultivo de um microorganismos contendo lipídeo utilizando métodos aqui descritos, (b) lise de um microorganismo contendo lipídio para produzir um lisado, (c) isolamento do lipídeo do microorganismo lisado e (d) transesterificação da composição lipídica, por meio da qual o biodiesel é produzido.

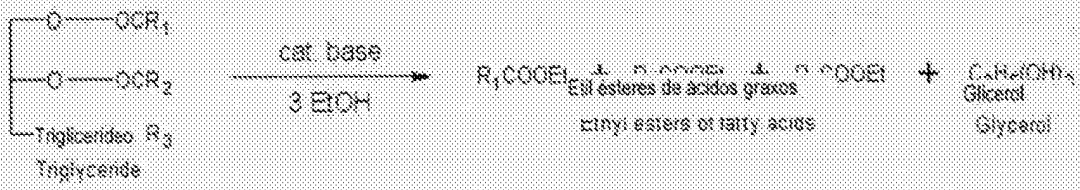
Métodos para o crescimento de um microorganismo, lise de um microorganismo para produzir um lisado, tratando o lisado em um meio que inclui um solvente orgânico para formar uma mistura heterogênea e separando o lisado tratado em uma composição lipídica foram descritos acima e também podem ser utilizados no método de produção de biodiesel.

As composições lipídicas podem ser submetidas à transesterificação para produzir ésteres de ácidos graxos de cadeia longa úteis como biodiesel. As reações de transesterificação preferidas são descritas a seguir e incluem a transesterificação catalisada por base e transesterificação usando lipases recombinantes.

Em um processo de transesterificação catalisado por base, os triacilgliceróis são reagidos com um álcool, como metanol ou etanol, na presença de um catalisador alcalino, geralmente hidróxido de potássio. Esta reação forma ésteres de metila ou de etila e a glicerina (glicerol) como um subproduto.

A). Processo Químico Geral

Óleos de animais e vegetais são normalmente feitos de triglicerídeos, que são ésteres de ácidos graxos livres com o álcool trihídrico, glicerol. Na transesterificação, o glicerol em um triacilglicerídeo (TAG) é substituído com um álcool de cadeia curta, como metanol ou etanol. Um esquema de reação típico é o seguinte:



Neste esquema, o álcool é desprotonado com uma base para torná-lo um nucleófilo mais forte. Comumente, o etanol ou metanol é usado em vasto excesso (até 50 vezes).

Normalmente, esta reação procederá ou excessivamente lenta ou não procederá. O calor, bem como um ácido ou base pode ser usado para ajudar a reação a proceder mais rápido. O ácido ou base não são consumidos pela reação de transesterificação, assim, eles não são reagentes, mas catalisadores. Quase todo biodiesel foi produzido usando a técnica catalisada por base pois requer apenas baixas temperaturas e pressões e produz mais de 98% de rendimento de conversão (visto que o óleo de partida é baixo em teor de humidade e ácidos graxos livres).

b). Usando Lipases Recombinantes

A transesterificação também tem sido realizada experimentalmente utilizando uma enzima, tal como uma lipase, em vez de uma base. A transesterificação catalizada por lipase pode ser realizada, por exemplo, a uma temperatura entre a temperatura ambiente e 80° C, e uma razão molar da TAG para o álcool inferior maior que 1:1, preferivelmente cerca de 3:1.

As lipases adequadas para uso na transesterificação incluem, entre outras, as enumeradas na Tabela 9. Outros exemplos de lipases úteis para a transesterificação são encontrados em, por exemplo, Patentes US. Nos. 4,798,793; 4,940,845 5,156,963; 5,342,768; 5,776,741 e WO89/01032.

Tabela 9. Lipases adequadas para o uso na transesterificação.

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), e Lipase QLM (Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya, Japan)

Um desafio ao uso de uma lipase para a produção de ésteres de ácidos graxos adequados para o biodiesel é que o preço da lipase é muito superior ao preço do hidróxido de sódio (NaOH) usado pelo processo de base forte. Este desafio tem sido discutido, utilizando uma lipase imobilizada, que pode ser reciclada. Entretanto, a atividade da lipase imobilizada deve ser mantida após ser reciclada por um número mínimo de ciclos para permitir um processo a base de lipase para competir com o processo de base forte em termos de custo de produção. As lipases imobilizadas são sujeitas à intoxicação por álcoois inferiores normalmente usados na transesterificação. A Patente US. No. 6.398.707 (expedida em 4 de junho de 2002 para Wu et al.) descreve métodos para melhorar a atividade de lipases imobilizadas e regeneração de lipases imobilizadas tendo atividade reduzida.

Em modalidades particulares, uma lipase recombinante é expressa nos mesmos microorganismos que produzem os lipídios nos quais a lipase age. As lipases

recombinantes adequadas incluem aquelas listadas acima na Tabela 9 e/ou tendo os números de acesso ao GenBank listados acima na Tabela 9, ou um polipeptídeo que tem pelo menos 70% de identidade de aminoácidos com uma das lipases listadas acima na Tabela 9 e que exibe a atividade da lipase . Em modalidades adicionais, a atividade enzimática está presente em uma seqüência que tem, pelo menos, cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos, cerca de 90%, pelo menos, cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade com uma das seqüências acima descritas, todas as quais são incorporadas por referência como se fossem plenamente estabelecidas. O DNA que codifica a lipase e o marcador selecionável é preferencialmente cDNA com códon otimizado. Os métodos de recodificação de genes para expressão em microalgas são descritos na Patente US. 7.135.290.

2.Padrões

O padrão internacional comum para o biodiesel é EN 14214. O ASTM D6751 é o padrão de biodiesel mais comum referenciado nos Estados Unidos e Canadá. A Alemanha usa DIN EN 14214 e o Reino Unido exige o cumprimento do BS EN 14214.

Testes industriais básicos para determinar se os produtos cumprem esses padrões geralmente incluem cromatografia gasosa, HPLC, e outros. O biodiesel que respeita os padrões de qualidade é muito não-tóxico, com uma classificação de toxicidade (LD_{50}) superior a 50 mL/kg.

B. <u>Diesel Renovável</u>

O diesel renovável inclui alcanos, como o C16:0 e C18:0 e, portanto, são distinguíveis do biodiesel. O diesel renovável de alta qualidade está em conformidade com o padrão ASTM D975.

Os lipídios produzidos pelos métodos da presente invenção podem servir como matéria-prima para produzir diesel renovável. Assim, em outro aspecto da presente invenção um método para a produção de diesel renovável é fornecido. O diesel renovável pode ser produzido pelo menos por três processos: processamento hidrotérmico (hidrotratamento); hidroprocessamento e liquefação indireta. Estes processos rendem destilados não-éster. Durante estes processos, os triacilglicerídeos produzidos e isolados como descrito aqui, são convertidos em alcanos.

Em uma modalidade preferida, o método para a produção de diesel renovável compreende (a) cultivo de um microorganismos contendo lipídeo utilizando métodos aqui descritos, (b) liese do microorganismo contendo lipídio para produzir um lisado, (c) isolamento do lipídeo do microorganismo lisado e (d) desoxigenação e hidrotratamento do lipídeo para produzir um alcano, por meio da qual o diesel renovável é produzido.

Os lipídios adequados para a fabricação de diesel renovável podem ser obtidos através da extração a partir da biomassa microbiana, utilizando um solvente orgânico como o hexano, ou através de outros métodos, como os descritos na Patente US. 5.928.696.

Em alguns métodos, o lipídeo microbiano é primeiro craqueado em conjunto com o hidrotratamento para reduzir o comprimento da cadeia de carbono e saturar ligações duplas, respectivamente. O material é então isomerizado, também em conjunto com o hidrotratamento. A fração de nafta pode então ser removida através de destilação, seguida pela destilação adicional para vaporizar e destilar os componentes desejados no combustível diesel para atender a um padrão D975, enquanto deixa os componentes que são mais pesados do que os desejados para satisfazer um padrão D 975. O hidrotratamento, hidrocraqueamento, desoxigenação e métodos de isomerização de óleos de modificação química, incluindo óleos de triglicerídeos, são bem conhecidos na técnica. Veja por exemplo os pedidos de patente Europeia EP1741768 (A1); EP1741767 (A1); EP1682466 (A1); EP1640437 (A1); EP1681337 (A1); EP1795576 (A1) e Patentes US. 7.238.277, 6.630.066, 6.596.155, 6.977.322, 7.041.866, 6.217.746 , 5.885.440, 6.881.873.

1. Hidrotratamento

Em uma modalidade preferida do método para produzir diesel renovável, o tratamento do lipídeo para a produção de um alcano é realizada pelo hidrotratamento da composição lipídica. No processamento hidrotérmico, normalmente, a biomassa é reagida em água a uma temperatura elevada e pressão para formar óleos e resíduos sólidos. As temperaturas de conversão são tipicamente 300° a 660°F, com pressão suficiente para manter a água em primariamente como um líquido, 100 a 170 atmosfera padrão (atm). Os tempos de reação são da ordem de 15 a 30 minutos. Após a reação ser concluída, os orgânicos são separados da água. Assim um destilado adequado para o diesel é produzido.

2. Hidroprocessamento

Um diesel renovável, conhecido como "diesel verde", pode ser produzido a partir de ácidos graxos pela tecnologia de hidroprocessamento tradicional. Os óleos contendo triglicérides podem ser hidroprocessados quer como co-alimentação com petróleo ou como uma alimentação dedicada. O produto é um óleo diesel que está em conformidade com a especificação ASTM D975. Assim, em uma outra modalidade preferida do método para produzir diesel renovável, o tratamento da composição lipídica para produzir um alcano é realizado pelo hidroprocessamento da composição lipídica.

Em alguns métodos de fabricação do diesel renovável, a primeira etapa do tratamento de um triglicerídeo é hidroprocessamento para saturar as ligações duplas, seguido pela desoxigenação a temperatura elevada na presença de hidrogênio e um catalisador. Em alguns métodos, a hidrogenação e desoxigenação ocorrem na mesma reação. Em outros métodos a desoxigenação ocorre antes da hidrogenação. A isomerização é então opcionalmente realizada, também na presença de hidrogênio e um catalisador. Componentes de nafta são preferencialmente removidos por destilação. Por exemplo, veja as Patentes US. 5.475.160 (hidrogenação de triglicerídeos); 5.091.116 (desoxigenação, hidrogenação e remoção de gás); 6.391.815 (hidrogenação) e 5.888.947 (isomerização).

Refinarias de petróleo usam o hidroprocessamento para remover as impurezas por tratamento de alimentações com hidrogênio. Temperaturas de conversão do hidroprocessamento são tipicamente 300° a 700°F. As pressões são tipicamente 40-100 atm. Os tempos de reação são tipicamente da ordem de 10 a 60 minutos.

Os catalisadores sólidos são utilizados para aumentar certas taxas de reação, melhorar a seletividade para determinados produtos, e otimizar o consumo de hidrogênio.

O hidrotratamento e hidroprocessamento finalmente levam a uma redução no peso molecular das alimentações. No caso dos óleos contendo triglicerídeos, a molécula de triglicerídeo é reduzida a quatro moléculas de hidrocarboneto sob condições de hidroprocessamento: uma molécula de propano e três moléculas de hidrocarbonetos mais pesados, geralmente na faixa de C8 a C18.

3. Liquefação Indireta

O diesel com teor de enxofre ultra-reduzido tradicional pode ser produzido a partir de qualquer forma de biomassa por um processo de duas etapas. Primeiro, a biomassa é convertida em um gás de síntese, uma mistura gasosa rica em hidrogênio e monóxido de carbono. Em seguida, o gás de síntese é cataliticamente convertido para líquidos. Normalmente, a produção de líquidos é feita usando a síntese Fischer-Tropsch (FT). Esta tecnologia é aplicável ao carvão, gás natural e óleos pesados. Assim, ainda em outra modalidade preferida do método para produzir diesel renovável, o tratamento da composição lipídica para produzir um alcano é realizado pela liquefação indireta da composição lipídica.

C. <u>Combustível de Aviação</u>

O uso anual dos E.U.A de combustível de aviação em 2006 foi de cerca de 21 bilhões de galões (cerca de 80 bilhões de litros). O combustível de avião é claro para cor de palha. O combustível mais comum é um combustível a base de óleo de parafina/não rotulado classificado como Avião A-1, que é produzido para um conjunto de especificações padronizadas internacionalmente. O combustível de avião é uma mistura de um grande número de hidrocarbonetos diferentes, possivelmente até um mil ou mais. A faixa de seus tamanhos (pesos moleculares ou números de carbono) é restrita pelas exigências do produto, por exemplo, ponto de congelamento ou ponto de fumaça. O combustível de avião tipo Querosone (incluindo Jato A e Jato A-1) tem uma distribuição de número de carbono entre cerca de 8 e 16 números de carbono. O combustível de avião do tipo wide-cut ou nafta (incluindo Jato B) geralmente tem uma distribuição de número de carbono entre cerca de 5 e 15 carbonos.

Ambos os aviões (Jato A e Jato B) podem conter um número de aditivos. Aditivos úteis incluem, entre outros, antioxidantes, agentes antiestáticos, inibidores de corrosão, e agentes inibidores do congelamento do sistema de combustível (FSII). Os antioxidantes impedem a gomificação e, geralmente, são baseados em fenóis alquilados, por exemplo,

AO-30, AO-31, ou AO-37. Os agentes antiestáticos dissipam a eletricidade estática e evitam faíscas. O Stadis 450 com ácido dinonilnaftilsulfônico (DINNSA) como ingrediente ativo, é um exemplo. Inibidores de corrosão, por exemplo, DCI-4A são usados para combustíveis civis e militares e DCI-6A é usado para combustíveis militares. Agentes FSII, incluem, por exemplo, Di-EGME.

Uma solução é misturar os combustíveis de algas com combustível de jato existentes. A presente invenção fornece uma solução deste tipo. Os lipídios produzidos pelos métodos da presente invenção podem servir como matéria-prima para produzir combustíveis de jato. Assim, em outro aspecto da presente invenção um método para a produção de combustível de jato é fornecido. Juntamente com dois métodos para produzir o combustível de jato a partir dos lipídios produzidos pelos métodos da presente invenção são fornecidos: craqueamento catalítico de fluido (FCC) e hidrodeoxigenação (HDO).

1. Craqueamento Catalítico Fluido

O Craqueamento Catalítico Fluido (FCC) é um método que é utilizado para produzir olefinas, principalmente propileno de frações cruas pesadas. Há relatos na literatura que os óleos vegetais tais como o óleo de canola poderiam ser processados através do FCC para resultar em um fluxo de hidrocarbonetos útil como um combustível gasolina.

Os lipídios produzidos pelo método da presente invenção podem ser convertidos em olefinas. O processo envolve o fluxo dos lipídios produzidos através de uma zona de FCC e coleta de uma corrente de produto composta de olefinas, que é útil como um combustível de jato. Os lipídios produzidos são contatados por um catalisador de craqueamento em condições de craqueamento para fornecer um fluxo de produto incluindo olefinas e hidrocarbonetos úteis como combustível de jato.

Em uma modalidade preferida, o método para a produção de combustível de jato compreende (a) cultivo de um microorganismos contendo lipídeo utilizando métodos aqui descritos, (b) lise de um microorganismo contendo lipídio para produzir um lisado, (c) isolamento do lipídeo do microorganismo lisado e (d) tratamento da composição lipídica, por meio da qual o coimbustível de jato é produzido.

Em uma modalidade preferida do método para produzir um combustível de jato, a composição lipídica pode ser fluída através de uma zona de craqueamento catalítico fluido, que, em uma modalidade, pode incluir a composição lipídica contato com um catalisador de craqueamento em condições de craqueamento para fornecer um fluxo de produto compreendendo olefinas C_2-C_5.

Em certas modalidades deste método pode ser desejável remover quaisquer contaminantes que podem estar presentes na composição lipídica. Assim, antes de fluir a composição lipídica através de uma zona de craqueamento catalítico fluido, a composição lipídica é pré-tratada. O pré-tratamento pode envolver o contato com a composição lipídica

com uma resina de troca iônica. A resina de troca iônica é uma resina de troca iônica ácida, tal como Amberlyst™-15 e pode ser usada como um leito em um reator através do qual a composição lipídica é fluida, tanto de fluxo descendente ou ascendente. Outros pré-tratamentos podem incluir lavagens ácido suaves, contatando a composição lipídica com um ácido, tal como sulfúrico, acético, nítrico ou ácido clorídrico. O contato é feito com uma solução de ácido diluída normalmente à temperatura ambiente e pressão atmosférica.

A composição lipídica, opcionalmente pré-tratada, é fluida para uma zona de FCC onde os componentes hidrocarbonáceos são craqueados para olefinas. O craqueamento catalítico é realizado pelo contato com a composição lipídica em uma zona de reação com um catalisador composto de material particulado finamente dividido. A reação é craqueada cataliticamente, ao contrário do hidrocraqueamento, e é realizada na ausência de hidrogênio adicionado ou consumo de hidrogênio. À medida que a reação de craqueamento prossegue, quantidades substanciais de coque são depositadas no catalisador. O catalisador é regenerado a altas temperaturas, pela queima de coque do catalisador em uma zona de regeneração. O catalisador contendo coque, aqui referida como "catalisador coqueado", é continuamente transportado da zona de reação para a zona de regeneração a ser regenerada e substituído essencialmente pelo catalisador regenerado livre de coque da zona de regeneração. A fluidização das partículas de catalisador por várias correntes gasosas permite o transporte do catalisador entre a zona de reação e zona de regeneração. Os métodos para o craqueamento de hidrocarbonetos, tais como os da composição lipídica descrita aqui, em um fluxo fluidizado do catalisador, transportando o catalisador entre as zonas de reação e regeneração e fazendo a combustão do coque no regenerador são bem conhecidos por aqueles versados na técnica de processos de FCC. Aplicações de FCC exemplares e catalisadores úteis para o craqueamento da composição lipídica para produzir olefinas C_2-C_5 são descritas nas Pat. US. Nos 6.538.169, 7.288.685, que são incorporadas em sua totalidade por referência.

Em uma modalidade, o craqueamento da composição lipídica da presente invenção, ocorre na seção ascendente, ou, alternativamente, na seção de içamento, da zona de FCC. A composição lipídica é introduzida na ascendente por um bico resultando na evaporação rápida da composição lipídica. Antes de entrar em contato com o catalisador, a composição lipídica terá normalmente uma temperatura de cerca de 149° C a 316°C (300° F a 600° F). O catalisador é fluido de um recipiente de mistura para a ascendente, onde contata a composição lipídica por um tempo de cerca de 2 segundos ou menos.

Os vapores do catalisador misturado e da composição lipídica reagida são então descarregados a partir do topo da ascendente através de uma saída e separados em um fluxo de vapor de produto craqueado incluindo olefinas e uma coleta das partículas do catalisador cobertas com quantidades substanciais de coque e geralmente referidas como "catalisador coqueado". Em um esforço para minimizar o tempo de contato da composição

lipídica e do catalisador, o que pode promover a conversão adicional dos produtos desejados para outros produtos indesejáveis, qualquer arranjo de separadores, tais como um arranjo de braço de redemoinho pode ser usado para remover o catalisador coqueado do fluxo de produto rapidamente. O separador, por exemplo, separador de braço de redemoinho, está localizado em uma porção superior de uma câmara com uma zona de separação situada na porção inferior da câmara. O catalisador separado pelo arranjo de braço de redemoinho desce para a zona de separação. O fluxo de vapor do produto craqueado compreendendo os hidrocarbonetos craqueados, incluindo olefinas leves e algumas saídas de catalisador da câmara através de um conduto que está em comunicação com os ciclones. Os ciclones removem as partículas catalisadoras restantes do fluxo de vapor do produto para reduzir as concentrações de partículas para níveis muito baixos. O fluxo de vapor do produto, em seguida, sai do topo do recipiente de separação. O catalisador separado pelos ciclones é retornado para o recipiente de separação e depois para a zona de separação. A zona de separação remove os hidrocarbonetos adsorvidos da superfície do catalisador, pelo contato contra-corrente com o vapor.

A baixa pressão parcial de hidrocarboneto opera para favorecer a produção de olefinas leves. Assim, a pressão ascendente é ajustada para aproximadamente de 172 a 241 kPa (25 a 35 psia) com uma pressão parcial de hidrocarboneto de cerca de 35 a 172 kPa (5 a 25 psia), com uma pressão parcial de hidrocarboneto preferida de cerca de 69 a 138 kPa (10 a 20 psia). Esta pressão parcial relativamente baixa de hidrocarbonetos é conseguida através do uso do vapor, como um diluente na medida em que o solvente é 10 a 55 % em peso da composição lipídica e preferivelmente de cerca de 15% em peso da composição de lipídios. Outros solventes, como o gás seco podem ser usados para alcançar pressões parciais de hidrocarboneto equivalentes.

A temperatura do fluxo craqueado na saída ascendente será de cerca de 510°C a 621°C (950°F a 1150°F). No entanto, as temperaturas da saída ascendente acima de 566°C (1050°) fazem o gás mais seco e mais olefinas. Considerando que, as temperaturas da saída ascendente abaixo de 566°C (1050°F) fazem menos de etileno e propileno. Assim, é preferível executar o processo de FCC, a uma temperatura preferida de cerca de 566°C a 630°C, pressão preferida de cerca de 138 kPa a cerca de 240 kPa (20 a 35 psia). Outra condição para o processo é o catalisador para a razão da composição lipídica que pode variar de 5 a cerca de 20 e, de preferência de cerca de 10 a cerca de 15.

Em uma modalidade do método para produzir um combustível de jato, a composição lipídica é introduzida na seção de içamento de um reator FCC. A temperatura na seção de içamento será muito quente e variará de cerca de 700°C (1292°F) a cerca de 760°C (1400°F) com um catalisador para a razão da composição lipídica de aproximadamente 100 a cerca de 150. Prevê-se que a introdução da composição lipídica na seção de içamento produzirá quantidades consideráveis de propileno e etileno.

Os produtos de hidrocarboneto gasosos e líquidos produzidos podem ser analisados pela cromatografia gasosa, HPLC, etc

2. Hidrodesoxigenação

Em outra modalidade do método para produzir um combustível de jato utilizando a composição lipídica ou os lipídios produzidos como aqui descrito, a estrutura da composição lipídica ou os lipídios é quebrada por um processo denominado hidrodesoxigenação (HDO).

HDO significa a remoção de oxigênio por meio de hidrogênio, ou seja, o oxigênio é removido ao quebrar a estrutura do material. Ligações duplas olefínicas são hidrogenadas e qualquer composto de enxofre e nitrogênio é removido. A remoção de enxofre é chamada hidrogenodessulfurização (HDS). O pré-tratamento e pureza das matérias-primas (composição lipídica ou lipídios) contribuem para a vida útil do catalisador.

Geralmente na etapa de HDO/HDS, o hidrogênio é misturado com o estoque de alimentação (composição lipídica ou lipídios) e, em seguida, a mistura é passada através de um leito catalisador como um fluxo co-corrente, ou como uma única fase ou uma fase de dois estoque de alimentação. Após a etapa de HDO/MDS, a fração do produto é separada e transferida para um reator de isomerização separado. Um reator de isomerização de material de partida biológico é descrito na literatura (FI 100 248) como reator co-corrente.

O processo para a produção de um combustível pela hidrogenação de uma alimentação de hidrocarbonetos, por exemplo, a composição lipídica ou os lipídios, também pode ser realizado pela passagem da composição lipídica ou lipídios como fluxo co-corrente com o gás hidrogênio através de uma primeira zona de hidrogenação e, posteriormente, o efluente de hidrocarbonetos é ainda hidrogenado em uma segunda zona de hidrogenação, passando o gás de hidrogênio para a segunda zona de hidrogenação como um fluxo contra-corrente em relação ao efluente de hidrocarbonetos. Aplicações de HDO exemplares e catalisadores úteis para o craqueamento da composição lipídica para produzir olefinas C_2-C_3 são descritas na Pat. US. No. 7.232.935, que é incorporada em sua totalidade por referência.

Normalmente, na etapa de hidrodesoxigenação, a estrutura do componente biológico, como a composição lipídica ou lipídios, é decomposta, compostos de oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre e hidrocarbonetos leves, como gás são removidos, e as ligações olefínicas são hidrogenadas. Na segunda etapa do processo, ou seja, na etapa chamada de isomerização, a isomerização é realizada pela ramificação da cadeia de hidrocarboneto e melhora do desempenho da parafina em baixas temperaturas.

Na primeira etapa, isto é, etapa HDO do processo de craqueamento, o gás de hidrogênio e a composição lipídica ou lipídios que são para ser hidrogenados são passados para um sistema de leito catalisador de HDO, quer como fluxos co-corrente ou contra-corrente, tal sistema de leito catalisador compreendendo um ou mais catalisadores de leito,

de preferência 1-3 leitos catalisadores. A etapa HDO normalmente é operada em uma maneira co-corrente. No caso de um sistema de leito catalisador HDO compreendendo dois ou mais leitos catalisadores, um ou mais leitos podem ser operados usando o princípio do fluxo contra-corrente.

Na etapa de HDO, a pressão varia entre 20 e 150 bar, de preferência entre 50 e 100 bar e a temperatura varia entre 200 e 500ºC, de preferência na faixa de 300-400ºC.

Na etapa de HDO, catalisadores de hidrogenação conhecidos, contendo metais do Grupo VII e/ou VIB do Sistema Periódico podem ser usados. Preferivelmente, os catalisadores de hidrogenação são Pd, Pt, Ni, NiMo suportados ou um catalisador CoMo, o suporte sendo de alumina e/ou sílica. Normalmente, catalisadores $NiMo/Al_2O_3$ e $CoMo/Al_2O_3$ são utilizados.

Antes da etapa de HDO, a composição lipídica ou lipídios podem, opcionalmente, ser tratados pela prehidrogenação sob condições mais suaves, evitando reações colaterais das ligações duplas. Tal prehidrogenação é realizada na presença de um catalisador de prehidrogenação a temperaturas de 50 400ºC e em pressões de hidrogênio de 1 200 bar, de preferência a uma temperatura entre 150º e 250ºC e a uma pressão de hidrogênio entre 10 e 100 bar. O catalisador pode conter metais do Grupo VIII e/ou VIB do Sistema Periódico. Preferivelmente, o catalisador de prehidrogenação é um Pd, Pt, Ni, NiMo suportado ou um catalisador CoMo, o suporte sendo de alumina e/ou sílica.

Um fluxo gasoso a partir da etapa de HDO contendo hidrogênio é resfriado e, em seguida, o monóxido de carbono, dióxido de carbono, nitrogênio, fósforo e compostos de enxofre, hidrocarbonetos leves gasosos e outras impurezas são removidas do mesmo. Após a compressão, o hidrogênio purificado ou hidrogênio reciclado é devolvido para o primeiro leito catalisador e/ou entre os leitos catalisadores para compensar o fluxo de gás retirado. A água é retirada do líquido condensado. O líquido é passado para o primeiro leito catalisador ou entre os leitos catalisadores.

Após a etapa de HDO, o produto é submetido a uma etapa de isomerização. É importante para o processo que as impurezas sejam removidas o mais completamente possível antes que os hidrocarbonetos sejam contatados com o catalisador de isomerização. A etapa de isomerização compreende uma etapa de divisão opcional, onde o produto da reação da etapa de HDO pode ser purificado pela divisão com vapor de água ou um gás adequado, tal como hidrocarboneto leves, nitrogênio ou hidrogênio. A etapa de divisão opcional é realizada em forma de contra-corrente em uma unidade a montante do catalisador de isomerização, onde o gás e líquido estão em contato um com o outro, ou antes do reator de isomerização real em uma unidade de divisão separada utilizar o princípio contra-corrente.

Após a etapa de divisão do gás de hidrogênio e composição lipídica hidrogenada ou lipídios, e opcionalmente, uma mistura de n-parafina, são passados para uma unidade de

isomerização reativa compreendendo um ou vários leitos catalisadores. Os leitos catalisadores da etapa de isomerização podem operar tanto de maneira co-corrente ou contra-corrente.

É importante para o processo que o princípio do fluxo contra-corrente seja aplicado na etapa de isomerização. Na etapa de isomerização isso é feito através da realização ou da etapa de divisão ou etapa de reação de isomerização ou ambas, em forma contra-corrente.

A etapa de isomerização e a etapa de HDO podem ser realizadas no mesmo recipiente de pressão, ou mesmo em recipientes de pressão separados. A prehidrogenação opcional pode ser realizada em um recipiente de pressão separado ou no mesmo recipiente de pressão do que o das etapas de isomerização e HDO.

Na etapa de isomerização, a pressão varia entre 20 e 150 bar, de preferência na faixa de 20 100 bar e a temperatura varia entre 200 e 500°C, de preferência na faixa de 300-400°C.

Na etapa de isomerização, os catalisadores de isomerização conhecidos na técnica podem ser usados. Os catalisadores de isomerização adequados contém peneira molecular e/ou um metal do Grupo VII e/ou um transportador. Preferencialmente, o catalisador de isomerização contém SAPO-11 ou SAPO41 ou ZSM-22 ou ZSM-23 ou ferrierita e Pt, Pd ou Ni e Al_2O_3 ou SiO_2. Catalisadores de isomerização típicos são, por exemplo, Pt/SAPO-11/Al_2O_3, Pt/ZSM-22/Al_2O_3, Pt/ZSM-23/Al_2O_3 e Pt/SAPO-11/SiO_2.

Como o produto, um componente de hidrocarbonetos de alta qualidade de origem biológica, útil como um combustível diesel para motores ou um componente do mesmo, é obtido, a densidade, o índice de cetano e desempenho em baixas temperadas do componente de hidrocarbonetos sendo excelentes.

IX. ENGENHARIA DE MICRÓBIO

Como mencionado acima, em certas modalidades da presente invenção é desejável modificar geneticamente um microorganismo para aumentar a produção de lipídios, modificar as propriedades ou as proporções dos componentes gerados pelo microorganismo, ou para melhorar ou fornecer características de crescimento de novo em uma variedade de materiais de matérias-primas. *Chlorella*, particularmente *Chlorella protothecoides*, *Clorela minutissima*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.*, e *Chlorella emersonii* são microorganismos preferido para o uso dos métodos de engenharia genética aqui descritos, embora outras espécies de *Chlorella*, assim como outras variedades de microorganismos podem ser utilizados.

Promotores, cDNAs e 3'UTRs, bem como outros elementos dos vetores, podem ser gerados através de técnicas de clonagem a partir de fragmentos isolados de fontes nativas (ver, por exemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press; e Patente US. 4,683,202). Alternativamente, os elementos

podem ser gerados sinteticamente utilizando métodos conhecidos (ver, por exemplo, Gene. 1995 Oct 16;164(1):49-53).

A. Otimização de Codon para Expressão

O DNA codificando um polipeptídeo a ser expresso em um microorganismo, por exemplo, uma lipase e marcador selecionável são preferencialmente cDNA de códon-otimizado. Os métodos de recodificação de genes para expressão em microalgas são descritos na Patente US. 7.135.290. Informações complementares para a otimização do códon estão disponíveis, por exemplo, no banco de dados de uso de codon do GenBank. Como exemplos não-limitantes do uso do códon, em *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella salina*, e *Chlorella protothecoides* são apresentados nas Tabelas 10, 11 e 12, respectivamente.

Tabela 10. Uso do códon em *Chlorella pyrenoidosa*.

Phe	UUU	39 (0.82)	Ser	UCU	50 (1.04)
	UUC	56 (1.18)		UCC	60 (1.25)
Leu	UUA	10 (0.20)		UCA	6 (0.96)
	UUG	46 (0.91)		UCG	43 (0.89)
Tyr	UAU	15 (0.59)	Cys	UGU	46 (0.77)
	UAC	36 (1.41)		UGC	73 (1.23)
ter	UAA	9 (0.00)	ter	UGA	43 (0.00)
ter	UAG	15 (0.00)	Trp	UGG	69 (1.00)
Leu	CUU	49 (0.97)	Pro	CCU	80 (0.98)
	CUC	73 (1.45)		CCC	88 (1.08)
	CUA	22 (0.44)		CCA	93 (1.14)
	CUG	103 (2.04)		CCG	65 (0.80)
His	CAU	50 (0.88)	Arg	CGU	39 (0.76)
	CAC	3 (1.12)		CGC	63 (1.23)
Gln	CAA	59 (0.84)		CGA	46 (0.90)
	CAG	2 (1.16)		CGG	47 (0.92)
Ile	AUU	24 (0.69)	Thr	ACU	32 (0.67)
	AUC	61 (1.76)		ACC	76 (1.60)
	AUA	19 (0.55)		ACA	41 (0.86)
Met	AUG	42 (1.00)		ACG	41 (0.86)
Asn	AAU	26 (0.75)	Ser	AGU	23 (0.48)
	AAC	3 (1.25)		AGC	67 (1.39)
Lys	AAA	32 (0.54)	Arg	AGA	51 (1.00)
	AAG	86 (1.46)		AGG	61 (1.19)
Val	GUU	36 (0.75)	Ala	GCU	57 (0.79)
	GUC	54 (1.13)		GCC	97 (1.34)
	GUA	30 (0.63)		GCA	89 (1.23)
	GUG	71 (1.49)		GCG	47 (0.65)
Asp	GAU	60 (0.95)	Gly	GGU	35 (0.60)
	GAC	66 (1.05)		GGC	78 (1.33)
Glu	GAA	41 (0.68)		GGA	54 (0.92)
	GAG	80 (1.32)		GGG	67 (1.15)

Tabela 11. Uso do Códon Preferido em *Dunaliella salina*.

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

Tabela 12. Uso do códon preferido em *Chlorella protothecoides*.

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

B. Promotores

[0001] Muitos promotores são ativos em microalgas, incluindo promotores que são endógenos para as algas sendo transformadas, bem como promotores que não são endógenos às algas sendo transformadas (ou seja, os promotores de outras algas, os promotores de plantas superiores, e os promotores da vírus de planta ou vírus de algas). Os promotores exógenos e/ou endógenos que são ativos em microalgas, e os genes de resistência a antibióticos funcionais em microalgas são descritos, por exemplo, Curr Microbiol. 1997 Dec;35(6):356-62 (Chlorella vulgaris); Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan;4(1):63-73 (Chlorella ellipsoidea); Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9 (Phaeodactylum tricornutum); Plant Mol Biol. 1996 Apr;31(1):1-12 (Volvox carteri); Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 22;91(24):11562-6 (Volvox carteri); Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C, PMID: 10383998, 1999 May;1(3):239-251 (Laboratory of Molecular Plant Biology, Stazione Zoologica, Villa Comunale, I-80121 Naples, Italy) (Phaeodactylum tricornutum and Thalassiosira weissflogii); Plant Physiol. 2002 May;129(1):7-12. (Porphyridium sp.); Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 21;100(2):438-42. (Chlamydomonas reinhardtii); Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Feb;87(3):1228-32. (Chlamydomonas reinhardtii); Nucleic Acids Res. 1992 Jun 25;20(12):2959-65; Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan;4(1):63-73 (Chlorella); Biochem Mol Biol Int. 1995 Aug;36(5):1025-35 (Chlamydomonas reinhardtii); J Microbiol. 2005 Aug;43(4):361-5 (Dunaliella); Yi Chuan Xue Bao. 2005 Apr;32(4):424-33 (Dunaliella); Mar Biotechnol (NY). 1999 May;1(3):239-251. (Thalassiosira and Phaedactylum); Koksharova, Appl Microbiol Biotechnol 2002 Feb;58(2):123-37 (various species); Mol Genet Genomics. 2004 Feb;271(1):50-9 (Thermosynechococcus elongates); J. Bacteriol. (2000), 182, 211-215; FEMS Microbiol Lett. 2003 Apr 25;221(2):155-9; Plant Physiol. 1994 Jun;105(2):635-41; Plant Mol Biol. 1995 Dec;29(5):897-907 (Synechococcus PCC

7942); Mar Pollut Bull. 2002;45(1-12):163-7 (Anabaena PCC 7120); Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Mar;81(5):1561-5 (Anabaena (various strains)); Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27;98(7):4243-8 (Synechocystis); Wirth, Mol Gen Genet 1989 Mar;216(1):175-7 (various species); Mol Microbiol, 2002 Jun;44(6):1517-31 and Plasmid, 1993 Sep;30(2):90-105 (Fremyella diplosiphon); Hall et al. (1993) Gene 124: 75-81 (Chlamydomonas reinhardtii); Gruber et al. (1991). Current Micro. 22: 15-20; Jarvis et al. (1991) Current Genet. 19: 317-322 (Chlorella); para os promotores adicionais ver também a tabela 1 da Patente US. 6.027.900).

O promotor usado para expressar um gene exógeno pode ser o promotor naturalmente ligado àquele gene ou pode ser um gene heterólogo. Alguns promotores são ativos em mais de uma espécie de microalgas. Outros promotores são específicos de espécie. Os promotores preferidos incluem promotores como RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtii* e promotores virais, como o vírus do mosaico de couve-flor (CMV) e vírus chlorella, que foram mostrados ativos em múltiplas espécies de microalgas (ver, por exemplo 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). Em outras modalidades, o promotor da malato desidrogenase *Botryococcus*, como um ácido nucléico compreendendo qualquer parte da SEQ ID NO: 3, ou o promotor RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEQ ID NO: 4) pode ser usado. Opcionalmente, pelo menos, 10, 20, 30, 40, 50 ou 60 nucleotídeos ou mais dessas seqüências contendo um promotor são utilizados. Os promotores preferidos endógenos a espécies do gênero *Chlorella* são SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

Os promotores preferidos úteis para a expressão de genes exógenos em *Chlorella* são listados na listagem de sequência deste pedido, tal como o promotor do gene *Chlorella* HUP1 (SEQ ID NO: 1) e o promotor de nitrato redutase de *Chlorella ellipsoidea* (SEQ ID NO: 2). Os promotores do vírus Chlorella também podem ser usados para expressar genes na *Chlorella*, tal como as SEQ ID NOs: 1-7 da Patente US. 6.395.965. Promotores ativos adicionais na *Chlorella* podem ser encontrados, por exemplo, em Biochem Biophys Res Commun. 1994 Oct 14;204(1):187-94; Plant Mol Biol. 1994 Oct;26(1):85-93; Virology. 2004 Aug 15;326(1):150-9; and Virology. 2004 Jan 5;318(1):214-23.

C. **Marcadores Selecionáveis**

Qualquer de uma grande variedade de marcadores selecionáveis podem ser empregados em um constructo transgênico útil para transformar *Chlorella*. Exemplos de marcadores selecionáveis adequado incluem o gene do nitrato redutase, o gene da higromicina fosfotransferase (HPT), o gene da neomicina fosfotransferase e o gene ble, que confere resistência à fleomicina. Métodos de determinação da sensibilidade aos antibióticos de microalgas são bem conhecidos. Por exemplo, Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9.

Mais especificamente, Dawson et al. (1997), Current Microbiology 35:356-362 (incorporado por referência, em sua totalidade), descreveu o uso do gene nitrato redutase (NR) a partir da *Chlorella vulgaris* como um marcador selecionável para mutantes de *Chlorella sorokiniana* deficientes em NR. Kim et al. (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73 (incorporada por referência, em sua totalidade), descreveu a utilização do gene HPT como um marcador selecionável para transformar *Chorella ellipsoidea*. Huang et al. (2007), Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:197-205 (incorporado por referência, em sua totalidade), relatou o uso de Sh ble como um marcador selecionável para *Chlorella sp. DT*.

D. <u>Expressão Indutível</u>

A presente invenção também fornece o uso de um promotor indutível para expressar um gene de interesse. Em particular, o uso de um promotor indutível para expressar um gene de lipase permite a produção da lipase, após o crescimento do microorganismo quando as condições foram ajustadas, se necessário, para aumentar a transesterificação, por exemplo, após o rompimento das células, redução do teor de água da mistura da reação, e/ou adição de álcool suficiente para acionar a conversão de TAGs para os ésteres de ácidos graxos.

Promotores indutíveis úteis na invenção incluem aqueles que mediam a transcrição de um gene ligado operavelmente em resposta a um estímulo, como uma pequena molécula fornecida exogenamente (por exemplo, glicose, como na SEQ ID NO: 1), temperatura (calor ou frio) luz, etc. Promotores adequados podem ativar a transcrição de um gene silencioso essencialmente ou super-regular, de preferência, substancialmente, a transcrição de um gene operavelmente ligado que é transcrito em um baixo nível. Neste último caso, o nível de transcrição da lipase preferivelmente, não interfere significativamente no crescimento do microrganismo no qual é expresso.

A expressão dos transgenes na *Chlorella* pode ser realizada por indução através de promotores, como o promotor que aciona o gene transportador de hexose *Chlorella* (SEQ ID NO: 1). Este promotor é fortemente ativado pela presença de glicose no meio de cultura.

E. <u>Expressão de Dois ou Mais Genes Exógenos</u>

Além disso, um microorganismo geneticamente modificados, como uma microalga, pode compreender e expressar dois ou mais genes exógenos, como, por exemplo, uma lipase e um gene lítico, por exemplo, um codificando uma enzima de degradação de polissacarídeo. Um ou ambos os genes podem ser expressos usando um promotor indutível, que permite o sincronismo relativo da expressão desses genes a serem controlados para aumentar a produção de lipídios e conversão em ésteres de ácidos graxos. A expressão de dois ou mais genes exógenos pode estar sob o controle do mesmo promotor indutível ou sob controle de diferentes promotores indutíveis. Nesta última situação, a expressão de um primeiro gene exógeno pode ser induzido por um primeiro período de

tempo (durante o qual a expressão de um segundo gene exógeno pode ou não pode ser induzida) e a expressão de um segundo gene exógeno pode ser induzida por um segundo período de tempo (durante o qual a expressão de um primeiro gene exógeno pode ou não ser induzida). São fornecidos aqui vetores e métodos de engenharia de micróbios de produção de lipídios para metabolizar a sacarose, que é uma característica vantajosa, pois permite que as células geneticamente modificadas convertam matérias-primas de cana-de-açúcar em lipídios.

Também são fornecidas aqui cepas geneticamente modificadas de microorganismos (por exemplo, microalgas, levedura oleaginosa, bactérias ou fungos), que expressam dois ou mais genes exógenos, como, por exemplo, uma tioesterase acil-ACP graxa e uma acil-CoA graxa/aldeído redutase, a ação combinada das quais produz um produto de álcool. Além disso, são fornecidas outras combinações de genes exógenos, incluindo, sem limitação, uma tioesterase acil-ACP graxa e uma redutase acil-CoA graxa para gerar aldeídos. Além disso, este pedido fornece a combinação de uma tioesterase acil-ACP graxa, uma redutase acil-CoA graxa, e um aldeído decarbonilase graxo para gerar alcanos. Um ou mais dos genes exógenos podem ser expressos através de um promotor indutível.

Exemplos de modificações adicionais adequadas para o uso na presente invenção são incluir cepas geneticamente modificadas de microalgas para expressar dois ou mais genes exógenos, um codificando um transportador de uma fonte de carbono fixa (como a sacarose) e um segundo codificando uma enzima sacarose invertase. Os organismos fermentáveis resultantes produzem hidrocarbonetos no menor custo de produção do que foi obtido por métodos previamente conhecido de produção de hidrocarbonetos biológica. A inserção de dois genes exógenos descritos acima pode ser combinada com a divisão da biossíntese dos polissacarídeos através da mutagênese direcionada e/ou aleatória, que induz o fluxo de carbono cada vez maior na produção de hidrocarbonetos. Individualmente e em combinação, a conversão trófica, engenharia para alterar a produção de hidrocarbonetos e tratamento com enzimas exógenas alteram a composição de hidrocarbonetos produzida por um microorganismo. A alteração pode ser uma mudança na quantidade de hidrocarbonetos produzida, a quantidade de uma ou mais espécies de hidrocarbonetos produzida em relação a outros hidrocarbonetos, e/ou os tipos de espécies de hidrocarbonetos produzidos no microorganismo. Por exemplo, as microalgas podem ser projetadas para produzir uma maior quantidade e/ou percentagem de TAGs.

F. <u>Expressão Compartimentada</u>

A presente invenção também fornece a expressão compartimentada de um gene de interesse. Em particular, pode ser vantajoso, em modalidades particulares, direcionar a expressão da lipase para um ou mais compartimentos celulares, onde é sequestrado da maioria dos lipídeos celulares até o início da reação de transesterificação. As organelas preferidas para direcionamento são cloroplastos, mitocôndrias e retículo endoplasmático.

1.Expressão em Cloroplastos

Em uma modalidade da presente invenção, a expressão de um polipeptídeo de um microorganismo é destinada aos cloroplastos. Métodos para direcionamento da expressão de um gene heterólogo para o cloroplasto são conhecidos e podem ser utilizados na presente invenção. Os métodos de direcionamento de produtos de genes estrangeiros em cloroplastos são descritos em Shrier et al. EMBO J. (1985) 4:25 32. Veja também Tomai et al. Gen. Biol. Chem. (1988) 263:15104 15109 e Pat. US. No. 4.940.835 para o uso de peptídeos de trânsito para a transposição de produtos de gene nuclear para o cloroplasto. Os métodos para direcionar o transporte de proteínas para o cloroplasto também são revistos em Kenauf TIBTECH (1987) 5:40 47. As seqüências de direcionamento de cloroplastos endógenas a *Chlorella* são conhecidas, tais como genes no genoma nuclear da *Chlorella* que codificam proteínas que são direcionadas para o cloroplasto, ver, por exemplo, números de acesso ao GenBank AY646197 e AF499684.

Wageningen UR-Plant Research International vende um vetor IMPACTVECTOR1.4, que utiliza o sinal de secreção da proteína da subunidade pequena de do Chrysanthemum morifolium para entregar uma proteína heteróloga no ambiente de estroma do cloroplasto (citoplásmico), transportando através de um sistema de membrana dupla. A proteína é fundida os primeiros 11 aminoácidos da proteína de rubisco madura, a fim de permitir o processamento adequado do sinal do peptídeo (Wong et al. Plant Molecular Biology 20: 81-93 (1992)). O sinal do peptídeo contém um íntron natural do gene RbcS.

Em outra abordagem, o genoma do cloroplasto é geneticamente modificado para expressar a proteína heteróloga. A transformação estável dos cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* (uma alga verde) usando o bombardeamento de células receptoras com microprojéteis de tungstênio de alta velocidade revestidos com DNA estrangeiro foram descritos. Veja, por exemplo, Boynton et al. Science (1988) 240: 1534 1538; Blowers et al. Plant Cell (1989) 1:123 132 e Debuchy et al., EMBO J. (1989) 8: 2803 2809. A técnica de transformação, usando micrioprojéteis de tungstênio, é descrita em Klein et al., Nature (London) (1987) 7:70 73. Outros métodos de transformação de cloroplastos de ambas as plantas e microalgas são conhecidos. Ver, por exemplo, as Patentes US. 5.693.507, 6.680.426 e Plant Physiol. 2002 May;129(1):7-12; and Plant Biotechnol J. 2007 May;5(3):402-12.

Conforme descrito na Patente US No. 6.320.101 (expedida em 20 de novembro de 2001 para Kaplan et al.; que é incorporada aqui por referência), as células podem ser tratadas quimicamente, de modo a reduzir o número de cloroplastos por célula para cerca de um. Em seguida, o ácido nucléico heterólogo pode ser introduzido dentro das células através de bombardeamento de partículas, com o objetivo de introduzir pelo menos uma molécula de ácido nucléico heterólogo nos cloroplastos. O ácido nucléico heterólogo é

selecionado tal que seja integrável no genoma do cloroplasto através de recombinação homóloga, que é facilmente efetuada por enzimas inerentes ao cloroplasto. Para esse efeito, o ácido nucléico heterólogo inclui, além de um gene de interesse, pelo menos uma seqüência de ácido nucleico que é derivada do genoma do cloroplasto. Além disso, o ácido nucléico heterólogo normalmente inclui um marcador selecionável. Mais detalhes relativos a esta técnica são encontrados nas Patentes US. Nos. 4.945.050 e 5.693.507, que são incorporadas aqui por referência. Um polipeptídeo pode ser produzido pelo sistema de expressão de proteína do cloroplasto.

A Patente US. No. 7.135.620 (expedida em 14 de novembro de 2006 para Daniell et al.; incorporada aqui por referência) descreve vetores de expressão do cloroplasto e métodos relacionados. Cassetes de expressão são constructos de DNA, incluindo uma seqüência de codificação e seqüências de controle adequadas para fornecer expressão própria da seqüência de codificação no cloroplasto. Cassetes de expressão típicos incluem os seguintes componentes: a região 5 ' não traduzida de um gene de microorganismo ou gene de cloroplasto como psbA que irá fornecer a transcrição e tradução de uma seqüência de DNA que codifica um polipeptídeo de interesse do cloroplasto, uma seqüência de DNA que codifica um polipeptídeo de interesse e uma região de terminação de translação e de transcrição, tais como uma região de repetição 3' invertida de um gene de cloroplasto que pode estabilizar o RNA dos genes introduzidos, reforçando assim a expressão do gene estrangeiro. O cassete pode opcionalmente incluir um gene de resistência a antibióticos.

Normalmente, o cassete de expressão é flanqueado por sítios de restrição convenientes para a inserção em um genoma adequado. O cassete de expressão pode ser flanqueado por seqüências de DNA a partir do DNA do cloroplasto para facilitar a integração estável do cassete de expressão no genoma do cloroplasto, em especial por recombinação homóloga. Alternativamente, o cassete de expressão pode permanecer não integrado, nesse caso, o cassete de expressão tipicamente inclui uma origem de replicação do cloroplasto, que é capaz de fornecer a replicação do DNA heterólogo no cloroplasto.

O cassete de expressão em geral, inclui uma região promotora de um gene capaz da expressão no cloroplasto. A região promotora pode incluir os promotores obteníveis dos genes do cloroplasto, como o gene psbA do espinafre ou ervilha, ou a região promotora rbcL e atpB de milho e promotores de Rrna. Exemplos de promotores são descritos em Hanley-Bowdoin e Chua, TIBS (1987) 12:67 70; Mullet et al. Plant Molec Biol. (1985) 4: 39 54; Hanley-Bowdoin (1986) PhD. Dissertation, the Rockefeller University; Krebbers et al., Nucleic Acids Res. (1982) 10: 4985 5002; Zurawaki et al., Nucleic Acids Res. (1981) 9:3251 3270; e Zurawski et al., Proc. Nat'l Acad Sci. U.S.A. (1982) 79: 7699 7703. Outros promotores podem ser identificados e a força relativa dos promotores assim identificados avaliada, pela colocação de um promotor de interesse 5' em um gene de marcador sem promotor e observação da sua eficácia em relação a transcrição obtida a partir de, por

exemplo, promotor do gene psbA, um promotor de cloroplasto relativamente forte. A eficácia da expressão do gene heterológo adicionalmente pode ser melhorada por qualquer uma de uma variedade de técnicas. Estes incluem o uso de vários promotores inseridos em tandem 5' para a gente heteróloga, por exemplo, um promotor de psbA duplo, a adição de sequências intensificadoras e similares.

Numerosos promotores ativos no cloroplasto de *Chlorella* podem ser usados para a expressão de genes exógenos no cloroplasto de *Chlorella* , tais como aqueles encontrados no número de acesso ao GenBank NC_001865 (cloroplasto *Chlorella vulgaris*, genoma completo).

Onde for desejado fornecer a expressão induzível do gene heterólogo, um promotor induzível e/ou uma região não traduzida 5' contendo uma sequências que fornecem regulação no nível de transcrição e/ou tradução (na extremidade 3') pode ser incluída no cassete de expressão. Por exemplo, a região não traduzida 5' pode ser de um gene onde a expressão é regulável pela luz. Da mesma forma, as regiões repetidas invertidas 3' poderiam ser usadas para estabilizar o RNA de genes heterólogos. Os genes induzíveis podem ser identificados pela expressão aumentada em resposta a um estímulo particular de interesse e expressão baixa ou ausente na falta de estímulo. Por exemplo, um gene induzível pela luz pode ser identificado, onde a expressão intensificada ocorre durante a irradiação com luz, enquanto a expressão substancialmente reduzida ou nenhuma expressão ocorre em baixa ou nenhuma luz. Promotores regulados pela luz a partir de microalgas verdes são conhecidos (ver, por exemplo, Mol Genet Genomics. 2005 Dec;274(6):625-36).

A região de terminação que é empregado será principalmente uma de conveniência, já que a região de terminação parece ser relativamente intercambiável entre cloroplastos e bactérias. A região de terminação pode ser nativa da região de iniciação de transcrição, pode ser nativa da seqüência do DNA de interesse, ou pode ser obtida de outra fonte. Ber, por exemplo, Chen and Orozco, Nucleic Acids Res. (1988) 16:8411.

Os cassetes de expressão podem ser transformados em uma célula vegetal de interesse por qualquer um dos vários métodos. Estes métodos incluem, por exemplo, os métodos biolísticos (Ver, por exemplo, Sanford, Trends in Biotech. (1988) 6:299 302, Patente US. No. 4.945.050; eletroporação (Fromm et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.) (1985) 82:5824 5828), uso de um feixe de laser, microinjeção ou qualquer outro método capaz de introduzir o DNA em um cloroplasto.

Descrições adicionais de vetores de expressão de cloroplasto adequados para uso em microrganismos como microalgas são encontrados nas Patentes US. Nos. 7081567 (expedida em 25 de julho de 2006 para Xue et al.); 6680426 (expedida em 20 de janeiro de 2004 para Daniell et al.) e 5693507 (expedida em 2 de dezembro de 1997 para Daniell et al.).

As proteínas expressas no genoma nuclear de *Chlorella* podem ser direcionadas para o cloroplasto usando sinais de direcionamento de cloroplasto. As seqüências de direcionamento de cloroplastos endógenas a Chlorella são conhecidas, tais como genes no genoma nuclear da Chlorella que codificam proteínas que são direcionadas para o cloroplasto, ver, por exemplo, números de acesso ao GenBank AY646197 e AF499684. As proteínas também podem ser expressas no cloroplasto de *Chlorella* pela inserção de genes diretamente no genoma do cloroplasto. A transformação do cloroplastos ocorre normalmente através de recombinação homóloga, e pode ser realizada se as seqüências do genoma do cloroplasto forem conhecidas para criação de vetores de direcionamento (ver, por exemplo, a seqüência do genoma completa de um cloroplasto de *Chlorella*; número de acesso ao GenBank NC_001865). Veja as seções anteriores para mais detalhes da transformação do cloroplasto.

2.Expressão na Mitocôndria

Em outra modalidade da presente invenção, a expressão de um polipeptídeo de um microorganismo é destinada à mitocôndria. Métodos para direcionamento de produtos de gene estrangeiro na mitocôndria (Boutry et al. Nature (London) (1987) 328:340 342) foram descritos, inclusive em microalgas verdes (ver, por exemplo, Mol Gen Genet. 1993 Jan;236(2-3):235-44).

Por exemplo, um vetor de expressão que codifica um sinal de secreção adequado pode ter como alvo uma proteína heterolóloga para a mitocôndria. O vetor IMPACTVECTOR1.5, de Wageningen UR-Plant Research International, usa o sinal de secreção CoxIV da levedura, que foi mostrado para fornecer proteínas na matriz mitocondrial. A proteína é fundida os primeiros 4 aminoácidos da proteína CoxIV da levedura, a fim de permitir o processamento adequado do sinal do peptídeo (Kohler et al. Plant J 11: 613-621 (1997)). Outras seqüências de direcionamento mitocondriais são conhecidas, incluindo aquelas funcionais em microalgas verdes. Por exemplo, ver FEBS Lett. 1990 Jan 29;260(2):165-8; e J Biol Chem. 2002 Feb 22;277(8):6051-8.

As proteínas expressas no genoma nuclear de *Chlorella* podem ser direcionadas para a mitocôndia usando sinais de direcionamento mitocôndriais. Consulte as seções anteriores aqui para mais detalhes do direcionamento e transformação da proteína mitocondrial.

3.Expressão no Retículo Endoplasmático

Em outra modalidade da presente invenção, a expressão de um polipeptídeo de um microorganismo é destinada ao retículo endoplasmático. A inclusão de uma retenção adequada ou sinal de classificação em um vetor de expressão garante que as proteínas são retidas no retículo endoplasmático (ER) e não vão a jusante, no Golgi. Por exemplo, o vetor IMPACTVECTOR1.3, de Wageningen UR-Plant Research International, inclui o sinal de classificação e retenção KDEL bem conhecido. Com este vetor, a retenção de ER

tem uma vantagem prática na medida em que foi relatada por melhorar os níveis de expressão em 5 vezes ou mais. A principal razão para isso parece ser que o ER contém concentrações mais baixas e/ou diferentes proteases responsáveis pela degradação pós-traducional das proteínas expressas que estão presentes no citoplasma. Os sinais de retenção do ER funcional em microalgas verdes são conhecidos. Por exemplo, ver Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):6225-30.

G. Transformação

As células podem ser transformadas através de qualquer técnica adequada, incluindo, por exemplo, biolística, eletroporação, transformação de contas de vidro e transformação de fio de carbeto de silício. Ver, por exemplo, Exemplos aqui.

Qualquer técnica conveniente para a introdução de um transgene em *Chorella* pode ser empregada na presente invenção. Dawson et al. (1997) (supra) descreveu o uso de bombardeios de micro-projéteis para introduzir o gene nitrato redutase (NR) da *Chlorella vulgaris* em mutantes de *Chlorella sorokiniana* deficientes em NR, resultando em transformantes estáveis. Resumidamente, esferas de tungstênio de 0,4 mícron foram revestidas com plasmídeo; 3 X 10^7 células de *C. sorokiniana* foram espalhadas no terceiro centro de uma placa de ágar não-seletiva e bombardeadas com o sistema PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery® (Bio-Rad).

Um método preferido para a introdução de um transgene em *Chlorella* é o método descrito por Kim et al. (2002), *Mar. Biotechnol.* 4:63-73. Kim relata a transformação dos protoplastos de *Chorella Ellipsoidea* utilizando $CaCl_2$ e polietileno glicol (PEG). Em particular, os protoplastos foram preparados pela crescimento de células de *C. ellipsoidea* para uma densidade de 1-2 X 10^8/Ml. As células foram recuperadas e lavadas por centrifugação por 5 minutos a 1600 g, e ressuspensas em 5 Ml de tampão de fosfato (pH 6.0) contendo 0,6 M de sorbitol, 0,6 M de manitol , 4% (peso/volume) de celulose (Calbiochem), 2% (peso/volume) macerase (Calbiochem), e 50 unidades de pectinase (Sigma). A suspensão celular foi incubada a 25°C por 16 horas no escuro, com agitação suave. Os protoplastos resultantes foram recuperados pela centrifugação a 400 g por 5 minutos. A pelota foi cuidadosamente ressuspensa em 5 Ml de meio f/2 contendo 0,6 M de sorbitol e 0,6 M de manitol e centrifugada a 400 g por 5 minutos. Esta pelota foi ressuspensa em 1 Ml de solução de 0,6 M sorbitol/manitol contendo 50 mM$CaCl_2$. Então, 5 mg de DNA do transgene foi adicionado, juntamente com 25 g do DNA timo de bezerro (Sigma), a 10^7-10^8 protoplastos em 0,4 Ml. Depois de 15 minutos a temperatura ambiente, 200 L de PNC (40% de polietileno glicol 4000, 0,8 M NaCl, 50 mM $CaCl_2$) foi adicionado e misturado suavemente durante 30 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, 0,6 Ml do meio f/2 suplementado com 0,6 M de solução de sorbitol/manitol, 1% de extrato de levedura e 1% de glicose foi adicionado, e as células transformadas foram incubadas a 25°C por 12 horas no escuro para a regeneração da parede celular. Um método semelhante

foi utilizado por Huang et al. (2007) (supra) para introduzir um transgene codificando mercúrio redutase em *Chlorella sp. DT.*

A eletroporação também tem sido empregada para transformar *Chorella.* Conforme relatado por Maruyama et al. (2004), Biotechnology Techniques 8:821-826 (incorporado por referência, em sua totalidade), esta técnica foi usada para introduzir um transgene em protoplastos de *Chlorella saccharophila* c-211-1a preparados a partir de células na fase estacionária . A expressão transiente do plasmídeo introduzido foi observada em um campo de força entre 600 e 900 V/cm, e uma duração de pulso de cerca de 400 ms, onde a alta permeabilidade da membrana de 70-kDa FITC-dextrano foi constatada.

Exemplos de expressão de transgenes em *Chlorella* podem ser encontrados na literatura (ver, por exemplo 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)). Veja também exemplos aqui.Exemplos de expressão de transgenes em levedura oleaginosa (por exemplo, *Yarrowia lipolitica*) podem ser encontrados na literatura (ver, por exemplo, Bordes et al. J Microbiol Methods, Jun 27 (2007)). Exemplos da expressão de transgenes em fungos (por exemplo, *Mortierella alpine*, *Mucor circinelloides* e *Aspergillus ochraceus*) também podem ser encontrados na literatura (ver, por exemplo, 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); e PCT/JP2004/012021). Exemplos de expressão de genes exógenos em bactérias como a *E. coli* são bem conhecidos; ver, por exemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press.

Vetores para a transformação de microorganismos, de acordo com a presente invenção podem ser preparados por meio de técnicas conhecidas familiares àqueles versados na técnica. A seqüência de nucleotídeos do constructo utilizado para a transformação de várias espécies de *Chlorella* corresponde a SEQ ID NO: 25. Em uma modalidade, um projeto de vetor exemplar para a expressão de um gene de lipase em um microorganismo como uma microalga contém um gene que codifica uma lipase em ligação operável com um promotor ativo nas microalgas. Alternativamente, se o vetor não contém um promotor em ligação operável com o gene de interesse, o gene pode ser transformado em células de tal forma a tornarem-se operacionalmente ligados a um promotor endógeno no ponto de integração do vetor. O método sem promoter de transformação foi comprovado por trabalhar em microalgas (ver, por exemplo Plant Journal 14:4, (1998),

pp.441-447). O vetor também pode conter um segundo gene que codifica uma proteína que, por exemplo, confere resistência a um antibiótico ou herbicida, ou seja, um marcador selecionável. Opcionalmente, um ou ambos os genes (s) é/são seguidos por uma sequência 3' não traduzida contendo um sinal de poliadenilação. Cassetes de expressão que codificam dois genes podem estar fisicamente ligados no vetor ou em vetores distintos. A co-transformação de microalgas também pode ser usada, na qual as moléculas de vetores distintos são simultaneamente usadas para transformar células (ver, por exemplo Protist 2004 Dec;155(4):381-93). As células transformadas podem ser opcionalmente selecionadas com base na capacidade de crescer na presença do antibiótico ou de outro marcador selecionável, em condições em que as células sem o cassete de resistência não iriam crescer.

Todas as referências citadas neste documento, incluindo patentes, pedidos de patentes e publicações, são incorporadas por referência em suas totalidades, se previamente especificamente incorporadas ou não. As publicações aqui mencionados são citadas a fim de descrever e divulgar os reagentes, metodologias e conceitos que podem ser utilizados em conexão com a presente invenção. Nada aqui contido deve ser interpretado como uma admissão de que estas referências são técnica anterior em relação às invenções aqui descritas.

Embora esta invenção tem sido descrita em conexão com modalidades específicas da mesma, será entendido que esta é capaz de outras modificações. Este pedido destina-se a cobrir quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção seguintes, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais saídas da presente descrição como vêm dentro da prática conhecida ou habitual dentro da técnica à qual a invenção pertence e como as características essenciais acima estabelecidas podem ser aplicadas.

X. EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são oferecidos para ilustrar, mas não limitar, a invenção reivindicada.

EXEMPLO 1

Cepas de *Chlorella* da coleção de cultura da Universidade do Texas foram testadas para o crescimento em glicerol e glicose. As seguintes espécies e cadeias de *Chlorella* foram 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 foi inoculada em meios sólidos em 25 ml de meio de base líquida (2g/L de extrato de levedura, 2.94mM de $NaNO_3$, 0.17mm de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.4mM de K_2HPO_4, 1.28mM de KH_2PO_4, 0.43mM de NaCl) e crescida em agitação a 27°C por 72 horas sob uma intensidade de luz de 7.5 $\mu Em^{-2}s^{-1}$. Essas culturas foram utilizadas para inocular cada cepa para uma densidade final de $1x10^5$ células por ml em placas de 24 poços contendo 2ml de (a) meio de base

somente, (b) meio de base mais 0,1% de glicose e (c) meio de base mais 0,5% de glicerol de grau reagente (EM Science, catalog # GX0185-6). As placas foram colocadas no escuro e cultivadas por 72 horas, agitandas a 27°C. As amostras de cada cepa cultivada em três condições foram diluídas 1:9:1 em H2O destilada e a absorbância foi lida a 600nm em um Molecular Devices SpectraMax 340PC. Todas as linhagens apresentaram um crescimento na presença de glicose e glicerol, em comparação aos meios de base somente.

EXEMPLO 2:

Cepas e Meio: *Chlorella protothecoides* # 1 (CEPA 250), # 2 (CEPA 264) e *Chlorella kessleri* # 1 (CEPA 398) foram obtidos a partir da Coleção de Cultura de Algas na Universidade do Texas (Austin, TX, E.U.A.). As culturas em estoque foram mantidas em meio de Proteose modificada. O meio de proteose modificado consistiu (g/L) em 0,25 g de $NaNO_3$, 0,09 g K_2HPO_4, 0,175 g KH_2PO_4 0,025 g, 0,025 g de $CaCl_2$»$2H_2O$, 0,075 g $MgSO_4$»$7H_2O$ e 2g de extrato de levedura por litro. Os resíduos de glicerol da produção de biodiesel (glicerol acidulado (AG) e glicerol não-acidulado (NAG)) foram obtidos da Imperial Western Products (Selma, CA, E.U.A.). Glicerol "puro" ou "de grau reagente" foi da EM Science (uma divisão da Merck KGA), catalog # GX0185-6.

Projeto Experimental e Medição de Crescimento: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em placas de 24 poços.

1.Proteose + 1% de glicerol puro

2.Proteose + 1% de glicerol acidulado

3.Proteose + 1% glicerol não-acidulado

4.Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose (adicionados após 72 horas)

5.Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose (adicionados após 72 horas)

6.Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose (adicionados após 72 horas)

Cada cepa foi inoculada com diferentes meios para a concentração de 5 x 10^5 células/ml. As culturas foram mantidas no escuro e foram agitadas pelo agitador orbital da Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm. Após 72 h de crescimento inicial, 1% (p/v) de glicose foi adicionado às amostras # 4, 5 e 6 e cultivado por outras 24 horas. Para medir o peso celular seco, 1 ml de cada cultura foi peletizada por centrifugação a 5.000 rpm por 5 min em uma centrífuga Eppendorf 5415C. Após retirar o sobrenadante, pelotas de células foram congeladas a -80°C e liofilizadas em um secador de gelo em escala laboratorial (Labconco, MO, E.U.A.). Os resultados são mostrados na Figura 1.

EXEMPLO 3

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides # 1 (CEPA 250), # 3 (CEPA 249) e Chlorella kessleri # 2 (Cepa397) foram obtidos a partir da Coleção de Culturas de Algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de

proteose modificado (ver exemplo 2).

Disposição experimental e Meio de Crescimento: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

1. Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose
2. Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose
3. Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose

Cada cepa foi inoculada com diferentes meios de 5 x 10^5 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 96 h, o crescimento celular foi medido para o peso seco de células (ver exemplo 2). Os resultados são mostrados na Figura 2.

EXEMPLO 4

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides # 3 (CEPA 249), # 4 (CEPA 31) e Chlorella kessleri # 2 (Cepa397) foram obtidos a partir da Coleção de Culturas de Algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificada (ver exemplo 2).

Disposição experimental e ensaio de lipídios: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

1. Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose
2. Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose
3. Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose

Cada cepa foi inoculada a um meio contendo diferentes gliceróis (puro, acidulado ou não-acidulado) para concentração de 5x 10^5 células/ml. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Os lipídios foram medidos após 96 h. Para medir a quantidade de teor de lipídios nas células, 100 µl de culturas foram coletadas e lavadas uma vez com o mesmo volume do meio. Para cada tubo, foram adicionados 5 µl de células lavadas e 200 mL de ácido sulfúrico 18 M. Os tubos foram incubados a 90°C em banho-maria por 30 min, e 1 ml de reagente de vanilina ácido fosfórico foi adicionado aos tubos e incubado a 37°C por 15 min. Para preparar o reagente de vanilina ácido fosfórico, 0,12 g de vanilina foi adicionado a 20 ml de água, e o volume ajustado para 100 ml com 85% de ácido fosfórico. A densidade óptica a 530 nm foi lida em uma cuveta de vidro contra um tubo de referência com 5 µl de água amostra. Os resultados são mostrados na Figura 3.

EXEMPLO 5

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides # 2 (CEPA 264) e Chlorella kessleri # 1 (Cepa 398) foram obtidos a partir da Coleção de Culturas de Algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificado

(ver exemplo 2).

Disposição experimental e ensaio de lipídios: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

Proteose + 1% de glicerol puro

Proteose + 1% glicerol não-acidulado

Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Cada cepa foi inoculada a um meio contendo diferentes gliceróis (puro ou não-acidulado) para concentração de 5x 10^5 células/ml. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 72 h de crescimento inicial, 1% de glicose foi adicionado à amostra # 3 e # 4 e cultivada por outras 24 horas. O teor de lipídios foi medido em todas as amostras (ver exemplo 4). A densidade óptica a 600 nm também foi medida para verificar absorvância não específica e subtraído de O.D. 530 nm para calcular a quantidade de lipídios. A curva de referência é composta de Trioleína dissolvida em clorofórmio variando de 1 a 10 mg. Os resultados são mostrados na Figura 4.

EXEMPLO 6

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides # 3 (CEPA 249) e Chlorella kessleri # 2 (Cepa 397) foram obtidos a partir da Coleção de Culturas de Algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificado (ver exemplo 2).

Disposição experimental e ensaio de lipídios: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Cada cepa foi inoculada a um meio contendo diferentes gliceróis (puro, acidulado ou não-acidulado) para concentração de 5x 105 células/ml. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 72 h de crescimento inicial, 1% de glicose foi adicionado e cultivado por outras 24 horas. O peso seco das células e teor de lipídios foi medido em todas as amostras (ver exemplos 2 e 5). A porcentagem de lipídio foi calculada a partir da quantidade total de lipídios dividido pelo peso seco das células. Os resultados são mostrados na Figura 5.

EXEMPLO 7

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides # 2 (CEPA 264) e Chlorella kessleri # 1 (Cepa 398) foram obtidos a partir da Coleção de Culturas de Algas na Universidade do

Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificado (ver exemplo 2).

Disposição experimental e ensaio de lipídios: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Foi inoculada em cada cepa meios contendo 1% de glicerol puro ou 1% de glicerol não-acidulado a 5 x 10^5 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 72 h de crescimento inicial, 1% de glicose foi adicionado e cultivado por outras 24 horas. O peso seco das células e teor de lipídios foi medido em todas as amostras (ver exemplos 1 e 4). A porcentagem de lipídio foi calculada a partir da quantidade total de lipídios dividido pelo peso seco das células. Os resultados são mostrados na Figura 6.

EXEMPLO 8

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides # 1 (CEPA 250), # 4 (CEPA 31) e Chlorella kessleri # 2 (Cepa 397) foram obtidos a partir da Coleção de Culturas de Algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificada (ver exemplo 2).

Disposição experimental e ensaio de lipídios: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

Proteose + 2% de glicose

2. Proteose + 1% de glicerol + 1% de glicose

Cada cepa foi inoculada com diferentes meios de 5 x 105 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 96 h de crescimento inicial, o teor de lipídios foi medido (ver exemplo 5). Os resultados são mostrados na Figura 7.

EXEMPLO 9

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides # 3 (CEPA 249), # 4 (CEPA 31) e Chlorella kessleri # 1 (Cepa 398) foram obtidos a partir da Coleção de Culturas de Algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificado (ver exemplo 2).

Disposição experimental e ensaio de lipídios: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

1. Proteose + 2% de glicose
2. Proteose + 1% de glicerol + 1% de glicose
3. Proteose + 1% de glicerol + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Cada cepa foi inoculada com diferentes meios de 5 x 105 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 72 h de crescimento inicial, 1% (w/v) de glicose foi adicionado ao meio da amostra # 3 e cultivado por outras 24 horas. O peso seco das células e teor de lipídios foi medido em todas as amostras (ver exemplos 2 e 5). A porcentagem de lipídio foi calculada a partir da quantidade total de lipídios dividido pelo peso seco das células. Os resultados são mostrados na Figura 8.

EXEMPLO 10

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides # 1 (CEPA 250), # 3 (CEPA 249) e Chlorella kessleri # 2 (Cepa 397) foram obtidos a partir da Coleção de Culturas de Algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificado (ver exemplo 2).

Disposição experimental e ensaio de lipídios: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

1. Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose
2. Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)
3. Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose
4. Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)
5. Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose
6. Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Cada cepa foi inoculada com diferentes meios de 5 x 105 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 72 h de crescimento inicial, 1% (w/v) de glicose foi adicionado ao meio da amostra # 2, #4 e #6 e cultivado por outras 24 horas. O teor de lipídios foi medido em todas as amostras (ver exemplo 5). Os resultados são mostrados na Figura 9.

EXEMPLO 11

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides # 1 (CEPA 250), # 3 (CEPA 249), #4 (CEPA 31) e Chlorella kessleri # 2 (Cepa 397) foram obtidos a partir da Coleção de Culturas de Algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificado (ver exemplo 2).

Disposição experimental e ensaio de lipídios: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

1. Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose

2. Proteose + 1% de glicerol puro + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)
3. Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose
4. Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)
5. Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose
6. Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Cada cepa foi inoculada com diferentes meios de 5 x 105 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 72 h de crescimento inicial, 1% (w/v) de glicose foi adicionado ao meio da amostra # 2, #4 e #6 e cultivado por outras 24 horas. O teor de lipídios foi medido em todas as amostras (ver exemplo 2). Os resultados são mostrados na Figura 10.

EXEMPLO 12

Vetor de construção

Um fragmento BamHI-SacII contendo o promotor CMV, um cDNA resistência à higromicina, e um CMV 3' UTR (SEQ ID NO: 5, uma subseqüência do vetor pCAMBIA1380, Cambia, Canberra, Austrália) foi clonado em BamHI e SacII sítios de pBluescrip e é aqui referido como pHyg.

Transformação Biobalística de Chlorella

Os transportadores de ouro S550d Seashell Technology foram preparados de acordo com o protocolo do fabricante. O plasmídeo pHyg linearizado (20 mg) foi misturado com 50µl de tampão de ligação e 60 µl (30 mg) de transportadores de ouro S550d e incubados no gelo por 1 min. Tampão de precipitação (100 µl) foi adicionado, e a mistura foi incubada em gelo por mais um 1 min. Após o vórtice, as partículas revestidas com DNA foram granuladas por rotação de 10.000 rpm em uma microcentrífuga Eppendorf 5415C por 10 segundos. O grânulo de ouro foi lavado uma vez com 500 ul de etanol 100% frio, revestidos por breve rotação na microcentrífuga, e ressuspenso com 50 µl de etanol frio. Depois de uma breve (1a 2 seg.) sonicação, 10 ml de partículas revestidas com DNA foram imediatamente transferidas para a membrana transportadora.

Chlorella cultura protothecoides (Universidade do Texas Culture Collection 250) foi cultivada em meio de proteose (2 g de extrato de levedura/ L, 2.94mM $NaNO_3$, 0,17mm $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,3 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,4mm K_2HPO_4, 1,28mm KH_2PO_4, 0,43mm NaCl) em um agitador giratório sob luz contínua de 75 mmol fótons m^{-2} s^{-1}, até chegar a uma densidade de células de $2x10^6$células/ml. As células foram colhidas, lavadas uma vez com água destilada estéril, e ressuspensas em 50 µl de meio. 1 x 10^7 células foram

espalhadas no terceiro centro de uma placa de meio de proteoses não-seletivo. As células foram bombardeadas com o sistema de liberação de partículas biobalística PDS-1000/He (Bio-Rad). Os discos de ruptura (1100 e 1350 psi) foram usados, e as placas foram colocadas 9 e 12 centímetros abaixo da tela/conjunto macrotransportador. As células puderam se recuperar a 25°C por 12 a 24 h. Após a recuperação, as células foram raspadas das placas com uma espátula de borracha, misturadas com 100 µl de meio e espalhadas sobre placas contendo higromicina (200 mg/ml). Após 7 a 10 dias de incubação a 25°C, as colônias representando células transformadas foram visíveis nas placas de 1100 e 1350 psi discos de ruptura e de 9 e 12 cm de distância. As colônias foram escolhidas e manchadas em placas de ágar seletiva para uma segunda rodada de seleção.

Transformação de Chlorella por Eletroporação

Chlorella cultura protothecoides foi cultivada em meio de proteose em um agitador giratório sob luz contínua de 75 mmol fótons $m^{-2} s^{-1}$, até chegar a uma densidade de células de $2x10^6$ células/ml. As células foram colhidas, lavadas uma vez com água destilada estéril, e ressuspensas em tampão tris-fosfato (20m M Tris-HCl, pH 7,0, 1 mM de fosfato de potássio), contendo 50 mM de sacarose a uma densidade de $4x10^8$ células/ml. Cerca de 250 µl de suspensão de células ($1x10^8$ células) foi colocada em uma cubeta de eletroporação descartável de 4 mm de abertura. Para a suspensão da célula, 5 g de DNA plasmidial linearizado pHyg e 200 µg de DNA transportador (DNA de esperma de salmão laminado) foi adicionado. A cubeta de eletroporação foi, então, encubada em banho-maria a 16°C por 10 minutos. Um pulso elétrico (1100 V/cm) foi então aplicado à célula em uma capacitância de 25 mF (não foi usado amperímetro para a eletroporação), utilizando um aparelho de eletroporação gene pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA). A célula foi então incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida a suspensão celular foi transferida para 50 ml de meio de proteose e agitada em um agitador giratório por 2 dias. Depois da recuperação, as células foram colhidas por centrifugação a baixa velocidade, ressuspensas em meio proteose e banhadas em baixa densidade em placas suplementadas com 200 mg/ml higromicina. As placas foram incubadas sob luz contínua de 75 mmol fótons $m^{-2} s^{-1}$. Transformantes apareceram como colônias em 1 a 2 semanas. As colônias foram escolhidas e manchadas em placas de ágar seletiva para uma segunda rodada de seleção.

Genotipagem

Um subconjunto de colônias, que sobreviveu a uma segunda rodada de seleção, foi cultivado e colhido em pequenos volumes. Grânulos de aproximadamente 5 a 10 uL de volume foram ressuspensos em 50 uL de 10mM NaEDTA em vórtice e em seguida incubadas a 100°C por 10. Os tubos foram então centrifugados rapidamente e sonicados

por 10 segundos, em seguida, centrifugados a 12.000 x g por 1 minuto. 2 uL do sobrenadante como modelo foi utilizado em uma reação de PCR 50 ul. Primers utilizados para a genotipagem foram SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 7. As condições de PCR foram as seguintes: 95 ° C 5 min x 1 ciclo; de 95°C 30 seg. - 58 ° C 30 seg. - 72 ° C 1 min 30 seg. x 35 ciclos; 72°C 10 min x 1 ciclo. O fragmento de 992 pb esperado foi encontrado em 6 das 10 colônias do método de biobalística e eletroporação de uma única colônia. Uma banda inespecífica de tamanho menor esteve presente em todas as pistas. Os resultados são mostrados na Figura 16. Para confirmar a identidade do fragmento amplificado 992bp, duas bandas de biobalística e a banda de eletroporação foram excisados do gel e seqüenciado individualmente. A seqüência de três bandas correspondeu ao fragmento esperado de 992 pb. (DNA ladder: Bionexus® All Purpose Hi-Lo® DNA ladder catálogo # BN2050).

EXEMPLO 13

Cepas e Meios: (a) Spirulina platensis (UTEX 2340) e (b) Navicula pelliculosa (UTEX 667) foram obtidos a partir da coleção de culturas de algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). A cultura de Spirulina foi mantida em meio de Spirulina e a Navicula foi mantida em meio de extrato de solo (MEV). O meio de Spirulina consistiu de 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, e 0,001 mM Vitamina B_{12}. O meio de extrato de solo consistiu de 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, e extrato de solo. Resíduos de glicerol da produção de biodiesel (glicerina acidulada (AG) e glicerol não-acidulado (NAG)) foram obtidos a partir de Imperial Western Products (Selma, CA, EUA).

Disposição experimental e Meio de Crescimento: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

(a)

7. Spirulina média + 2% de glicose
8. Meio de pirulina + 2% de glicerol de grau reagente
9. Meio de Spirulina + 2% de glicerol não-acidulado
10. Meio de Spirulina + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose

(b)

1. SEM + 2% de glicose
2. SEM + 2% de glicerol de grau reagente

3. SEM + 1% de glicerol de grau reagente + 1% de glicose
4. SEM + 2% de glicerol acidulado
5. SEM + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose
6. SEM + 2% de glicerol não-acidulado
7. SEM + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose

Cada cepa foi inoculada com diferentes meios de 5 x 105 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Os lipídios foram medidos após 96 h. Para medir a quantidade de teor de lipídios nas células, 100 µl de culturas foram coletadas e lavadas uma vez com o mesmo volume do meio. Para cada tubo, foram adicionados 5 µl de células lavadas e 200 mL de ácido sulfúrico 18 M. Os tubos foram incubados a 90°C em banho-maria por 30 min, e 1 ml de reagente de vanilina ácido fosfórico foi adicionado aos tubos e incubado a 37°C por 15 min. Para preparar o reagente de vanilina ácido fosfórico, 0,12 g de vanilina foi adicionado a 20 ml de água, e o volume ajustado para 100 ml com 85% de ácido fosfórico. A densidade óptica a 530 nm foi lida em uma cuveta de vidro contra um tubo de referência com 5 µl de água amostra. A curva de referência é composta de Trioleína dissolvida em clorofórmio variando de 1 a 10 mg.

Para medir o peso seco das células, 0,5 ml de cada cultura foi granulada por centrifugação a 5000 rpm por 5 min. Após retirar o sobrenadante, os aglomerados de células foram congelados a -80°C e secos durante a noite em um sistema de congelamento (Labconco, MO, EUA). A porcentagem de lipídio foi calculada a partir do montante total de lipídeos dividido pelo peso seco de células. Os resultados são mostrados na Figura 11.

EXEMPLO 14

Cepas e Meios: Scenedesmus armatus (UTEX 2552) foi obtido a partir da coleção de culturas de algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificada. O meio de proteose modificado consistiu (g/L) de 0,25g $NaNO_3$, 0,09g K_2HPO_4, 0,175g KH_2PO_4 0,025g, 0,025g de $CaCl_2$ $2H_2O$, 0,075g $MgSO_4$ $7H_2O$ e 2g de extrato de levedura por litro.

Disposição experimental, crescimento e medição de lipídeos: Para cada condição de crescimento, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

(a), (b)

1. Proteose + 2% de glicose
2. Proteose + 2% de glicerol
3. Proteose + 2% de glicerol acidulado
4. Proteose + 2% glicerol não-acidulado
5. Proteose + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose

Scenedesmus armatus (UTEX 2552) foi inoculada com diferentes meios de 5 x 10^5 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 96 h, o crescimento celular foi medido por peso de células secas, e o teor de lipídios foi medido por ensaio de vanilina de fósforo. (ver exemplo 3). A porcentagem de lipídio foi calculada a partir do montante total de lipídeos dividido pelo peso seco de células. Os resultados são mostrados na Figura 12.

EXEMPLO 15

Cepas e Meios: Navicula pelliculosa (UTEX 667) foi obtido a partir da coleção de culturas de algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de extrato de solo (ver exemplo 13).

Disposição experimental e Meio de Crescimento: Para cada condição de crescimento, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

1. SEM + 2% de glicose
2. SEM + 2% de glicerol
3. SEM + 2% de glicerol acidulado
4. SEM + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose
5. SEM + 2% de glicerol não-acidulado
6. SEM + 1% de glicerol não-acidulado + 1% de glicose

Navicula pelliculosa (UTEX 667) foi inoculada a um meio contendo diferentes gliceróis (puro, acidulado ou não-acidulado) para concentração de 5x 10^5 células/ml. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 96 h, o crescimento celular foi medido por peso seco de células (ver exemplo 13). Os resultados são mostrados na Figura 13.

EXEMPLO 16

Cepas e Meios: Spirulina platensis (UTEX 2552) e (b) Navicula pelliculosa (UTEX 667) foram obtidos a partir da coleção de culturas de algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em médio de proteose modificado para Scenedesmus armatus e meio de extrato de solo para extrair Navicula pelliculosa (ver exemplo 1).

Disposição experimental e Meio de Crescimento: Para cada cepa, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

Scenedesmus armatus

5. Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose
6. Proteose + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Navicula pelliculosa

1. SEM + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose
2. SEM + 1% de glicerol acidulado + 1% de glicose (adicionada após 72 hr)

Cada cepa foi inoculada com diferentes meios de 5 x 105 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 72 h de crescimento inicial, 1% de glicose foi adicionado à amostra # 2 e cultivada por outras 24 horas. O crescimento celular foi medido por peso seco de células (ver exemplo 13). Os resultados são mostrados na Figura 14.

EXEMPLO 17

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides (UTEX 31) foi obtido a partir da coleção de culturas de algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificada (ver exemplo 1).

Disposição Experimental Para cada condição, 1 ml do seguinte meio diferente foi preparado em 24 poços.

4. Proteose
5. Proteose + 0,5% de glicose
6. Proteose + 0,5% de glicose
7. Proteose + 0,25% de glicose + 0,25% de xilose

Chlorella protothecoides # 4 (UTEX 31) foi inoculado para o meio contendo diferentes açúcares (glicose, xilose) e 3 x 10^5 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Os resultados são mostrados na Figura 15.

EXEMPLO 18

Chlorella protothecoides cepas #1, #3 e #4 foram obtidas a partir da coleção de culturas de algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em estoque médio de proteose modificado (ver exemplo 1). Para cada condição, foram preparados, em 24 poços, 1 ml dos diferentes meios a seguir.

1. Proteose
2. Proteose + 1 % de glicose
3. Proteose + 1 % de frutose

Cada cepa foi inoculada com diferentes açúcares (glicose ou frutose) para 1 x 10^6 células/ml de concentração. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm. Após 96 horas de crescimento, a densidade da célula foi medida por contagem de número de células para cada cultura. Os resultados são mostrados na Figura 20.

EXEMPLO 19

Chlorella em sacarose

Materiais e Métodos: Chlorella protothecoides (UTEX 249) foi inoculado em três 30ml frascos de meio de protease com 1% de sacarose (2,94mM $NaNO_3$, 0,428mM K_2HPO_4, 1,28mM KH_2PO_4, 0,427mM NaCl, 0,17mM $CaCl_2$-$2H_2O$, 0,3mM $MgSO_4$-$7H_2O$, proteose peptone 1g/L) para uma densidade de celular final de $4x10^5$ celular por ml. A invertase (Sigma # I4504) foi adicionada a duas das culturas em 0,01U/ml e 0,05U/ml. As três culturas foram cultivadas no escuro por ~ 60hrs agitando em 150rpm.

Resultados: As contagens de células finais foram realizadas em todas as três culturas após ~ 60hrs de agitação no escuro. O frasco de controle alcançou $4,4x10^5$ células por ml, enquanto os frascos de 0,01U/ml e 0,05U/ml atingiram densidades celulares de $1x10^8$ e $3x10^8$, respectivamente. No final do experimento, cada frasco foi verificado quanto à contaminação por análise microscópica e todos estavam limpos.

EXEMPLO 20

Cepas de Chlorella crescendo em sacarose

Culturas de Chlorella kessleri ((a) UTEX 397 e (b) UTEX 398) e Chlorella fusca ((a) UTEX 251 e (b) UTEX 1801) foram inoculadas de culturas de líquidos autotróficos em 10ml de proteose + 1% de meio de sacarose em frascos de 50 ml a 1 x 10^6 células/ml. As culturas de controle também foram inoculadas com a mesma densidade com somente meio de proteose. As culturas foram crescidas a 28°C no escuro com agitação de 250 rpm durante 7 dias, nos quais o ponto de densidade das células foi medido por hemocitômetro. Como mostrado nas figuras 21 e 22, todas as quatro cepas cresceram em sacarose, em comparação com a densidade celular inicial e o controle somente de proteose.

EXEMPLO 21

Crescimento de Chlorella protothecoides em melaço com uma invertase sacarose

Preparação de células de Chlorella para inoculação: Uma cultura de líquido 10 ml de Chlorella foi iniciada retirando o inóculo de uma placa de proteose sólida. As culturas foram crescidas em luz por cerca de 2 dias a 26°C. O crescimento foi medido utilizando um densidômero óptico (DO) a 750 nm, determinando o peso seco das células.

Preparação de Soluções de Melaço e Açúcar: Uma solução de 5% foi preparada com glicose, sacarose e melaço de três amostras diferentes (rotuladas BS1 BS2 e HTM) obtidas a partir do processamento industrial da cana em açúcar, como mostrado na Tabela 13. Verificou-se que o pH de todas as unidades estavam na faixa de 6 a 6,6, e os estoques foram então autoclavados.

Tabela 13. Soluções de melaço e açúcar.

Melaço	% Açúcar	5% de açúcar dil. em 100mls
		gramas ou mls
HTM	78.72	6.4
BS1 (FL)	44.25	11.3
BS2 (AU)	51.55	9.7
Sacarose	100	5
Glicose	100	5

Preparação de Solução de invertase: Uma solução de invertase de 40 unidades/ml foi preparada pela reconstituição de 1 mg de uma Invertase (Sigma) 400 unid/mg em 10 mililitros de água destilada.

Condições experimentais e Instalação: 10 ml de culturas foram preparadas, cada uma composta de 1% de melaço/concentração de açúcar final, 0,05 unidades/ml de invertase e 1,0 x 10^6 células por ml de Chlorella protothecoides em um meio de protease de base. As culturas foram numeradas da seguinte forma: (1) controle apenas de meio; (2) 1 HTM%; (3) 1 BS1%; (4) 1 BS2%; (5) 1% de glicose e (6) 1% de sacarose. Um conjunto de controle semelhante também foi preparado sem a adição de invertase. As culturas foram cultivadas no escuro por cinco dias com agitação de 250 rpm a 28°C.

Resultados: O crescimento das células de Chlorella protothecoides foi avaliado após cinco dias de incubação sobre a respectiva matéria-prima na escuridão. Como mostrado nas figuras 23 e 24, as células podem ser cultivadas em melaço, na presença de uma invertase sacarose com rendimentos comparável ao do crescimento da glicose grau de reagente puro.

EXEMPLO 22

Engenharia Genética de Chlorella protothecoides para expressar uma invertase exógena de sacarose

Cepas e Meios: Chlorella protothecoides (UTEX 250) foi obtido a partir da coleção de culturas de algas na Universidade do Texas (Austin, TX, EUA). As culturas foram mantidas em meio de proteose modificada. O meio de proteose modificado consistiu de 0,25g $NaNO_3$, 0,09g K_2HPO_4, 0,175g KH_2PO_4 0,025g, 0,025g de $CaCl_2$ $2H_2O$, 0,075g $MgSO_4$ $7H_2O$ e 2g de extrato de levedura por litro (g/L).

Construção de Plasmídeo: Para expressar a forma segregada de invertase em Chlorella protothecoides, um gene SUC2 Saccharomyces cerevisiae foi colocado sob o controle de três promotores diferentes: Promotor 35S de vírus mosaico da couve-flor (CMV), promotor de vírus Chlorella (NC-1A), e promotor HUP1 Chlorella. Um gene de

levedura SUC2 foi sintetizado para acomodar o uso do codon otimizado para C. protothecoides e inclui uma seqüência de sinal necessária para dirigir a secreção de invertase extracelular. Cada construção foi construída em pBLUESCRIPT KS+, e EcoRI/ASCI, AscI/XhoI e sítios XhoI/BamHI foi introduzida para cada promotor, gene da invertase e CMV 3'UTR, respectivamente, por amplificação PCR utilizando perimes específicos. Produtos de PCR purificados foram clorados em seqüência. Uma ilustração da construção final é mostrada na Figura 25.

Transformação de Chlorella protothecoides: Uma cultura de Chlorella protothecoides foi cultivada em meio de proteose em um agitador giratório sob luz contínua de 75 mamou fótons m^{-2} s^{-1}, até chegar a uma densidade de células de $2x10^6$ células/ml.

Para a transformação biolística, os transportadores de ouro S550d Seashell Technology foram preparados de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, uma construção linearizada (20 µg) por BsaI foi misturada com 50µl de tampão de ligação e 60 µl (3 mg) de transportadores de ouro S550d e incubados no gelo por 1 min. Tampão de precipitação (100 µl) foi adicionado, e a mistura foi incubada em gelo por mais um 1 min. Após o vórtice suave, as partículas revestidas de DNA foram granulados por rotação de 10.000 rpm em uma microcentrífuga Eppendorf 5415C por 10 segundos. O grânulo de ouro foi lavado uma vez com 500 ul de etanol 100% frio, revestidos por breve rotação na microcentrífuga, e ressuspenso com 50 µl de etanol frio. Depois de uma breve (1-2 seg.) sonicação, 10 ml de partículas revestidas com DNA foram imediatamente transferidas para a membrana transportadora. As células foram colhidas, lavadas uma vez com água destilada estéril, ressuspensas em 50 µl de meio (1 x 10^7 células), e foram espalhadas no terceiro centro de uma placa de protease não-seletiva. As células foram bombardeadas com o sistema de liberação de partículas biobalística PDS-1000/He (Bio-Rad). Os discos de ruptura (1100 e 1350 psi) foram usados, e as placas foram colocadas 9 e 12 cm abaixo da tela/conjunto macrotransportador. As células se recuperaram a 25°C por 12 a 24 horas. Sob recuperação, as células foram raspadas das placas com uma espátula de borracha, misturadas com 100 µl de meio e espalhadas sobre placas de proteose modificada com 1% de sacarose. Após 7 a 10 dias de incubação a 25°C no escuro, as colônias que representam células transformadas eram visíveis nas placas.

Para transformação com eletroporação, as células foram colhidas, lavadas uma vez com água destilada estéril, e ressuspensas em tampão tris-fosfato (20m M Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM de fosfato de potássio), contendo 50 mM de sacarose a uma densidade de $4x10^8$ células/ml. Cerca de 250 µl de suspensão de células (1x108 células) foi colocada em uma cubeta de eletroporação descartável de 4 mm de abertura. Foi adicionado 5 µg de DNA

plasmidial linearizado pHyg e 200 μg de DNA transportador (DNA de esperma de salmão laminado) para a suspensão de células. A cubeta de eletroporação foi, então, incubada em banho-maria a 16°C por 10 minutos. Um pulso elétrico (1100 V/cm) foi então aplicado à célula em uma capacitância de 25 mF (não foi usado amperímetro para a eletroporação), utilizando um aparelho de eletroporação gene pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA). A cuveta foi então incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida a suspensão celular foi transferida para 50 ml de meio de proteose e agitada em um agitador giratório por 2 dias. Depois da recuperação, as células foram colhidas em baixa velocidade (rpm 4000), ressuspensas em meio de proteose, e laminadas à densidade baixa em placas de proteose com 1% de sacarose. Após 7 a 10 dias de incubação a 25°C no escuro, as colônias que representam células transformadas eram visíveis nas placas.

Transformantes de Triagem e Genotipagem: As colônias foram colhidas de placas de protease modificada crescidas no escuro com 1% de sacarose, e aproximadamente a mesma quantidade de células foram transferidas para 24 poços contendo 1 ml de meio líquido de proteose modificada com 1% de sacarose. As culturas foram mantidas no escuro e agitadas por agitador orbital de Labnet (Berkshire, Reino Unido) a 430 rpm por 5 dias.

Para verificar a presença do gene da invertase introduzido em transformantes de Chlorella, o DNA de cada transformante foi isolado e amplificado com um conjunto de primers de gene-específico (construção CMV: Forward primer (CAACCACGTCTTCAAAGCAA) (SEQ ID NO: 6) / primer reverso (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO: 9), construtor de CV: primer anterior (TTGTCGGAATGTCATATCAA) (SEQ ID NO: 10) / primer reverso (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO: 11), e construção de HUP1: primer anterior (AACGCCTTTGTACAACTGCA) (SEQ ID NO: 12) / primer reverso (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (SEQ ID NO: 13)). Para o isolamento rápido do DNA, um volume de células (aproximadamente 5 a 10 uL em tamanho) foi ressuspenso em 50 uL de 10 mM Na-EDTA. A suspensão celular foi incubada a 100°C por 10 min e sonicada por 10 seg. Após centrifugação a 12000G por 1 min, 3 uL do sobrenadante foi utilizado para a reação de PCR. A amplificação de PCR foi realizada no termociclador de DNA (Perkin-Elmer GeneAmp 9600). A mistura de reação (50 uL) continha 3 uL de DNA extraído, 100 pmol de cada um dos respectivos primers descritos acima, 200 uM de dNTP, 0,5 unidades de Taq DNA polimerase (NEB) e tampão de Taq DNA polimerase acordo com as instruções do fabricante. A desnaturação do DNA foi realizada a 95°C por 5 min para o primeiro ciclo, e depois de 30 seg. O recozimento do primer e as reações de extensão foram realizados a 58°C por 30 seg. e 72°C por 1 min, respectivamente. Os produtos de PCR foram visualizados em 1% de géis de agarose corado com brometo de etídio. A figura

26 mostra os resultados do genótipo da PCR de transformantes C. protothecoides usando o primers gene específicos acima identificado. As setas mostram o tamanho esperado do produto da PCR, e as estrelas representam amostras de DNA de cada transformante mostrando o produto de PCR correspondente ao tamanho esperado (V: Apenas vetores, WT: tipo selvagem).

Crescimento em Cultura Líquida: Após cinco dias de crescimento no escuro, o transformante genótipo-positivo apresentou crescimento positivo em meio de proteose líquida mínima + 1% de sacarose no escuro, enquanto células de tipo selvagem não apresentaram crescimento no mesmo meio no escuro.

EXEMPLO 23

Transformação de cepas de algas com uma invertase secretada derivada de S. cerevisiae

Invertase secretada: Um gene codificando uma sacarose invertase secretada (Banco de Gene acessão NP_012104 de Saccharomyces cerevisiae) foi sintetizado de novo, como um fragmento bp 1599 ASC I-Xho que posteriormente foi subclonado em um derivado pUC19 possuindo o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e 3 'UTR como cassetes EcoR I/Asc e Xho/Sac I, respectivamente.

Crescimento de Células de Algas: O meio utilizado nesses experimentos foi o meio de base líquida (ver Exemplo 1) e meio de base sólida (+ 1,5% de agarose) que contêm carbono fixo na forma de sacarose ou glicose (como designados) a 1% de concentração final. As cepas utilizadas neste experimento não cresceram no escuro em meio de base na ausência de uma fonte adicional de carbono fixo. As espécies foram riscadas em placas, e cresceram no escuro a 28°C. Colônias únicas foram colhidas e utilizadas para inocular 500 mL de meio de base líquida contendo 1% de glicose e conseguiram crescer no escuro até a fase de log médio, medindo a contagem celular a cada dia. Cada uma das seguintes cepas foram previamente testadas quanto ao crescimento da sacarose no escuro como uma única fonte de carbono e não apresentaram nenhum crescimento, e assim foram escolhidas para a transformação de uma invertase secretada: (1) Chlorella protothecoides (UTEX 31); (2) Chlorella minutissima (UTEX 2341); e (3) Chlorella emersonii (CCAP 211/15).

Transformação das células de algas através de partículas de Bombardeamento: A cultura suficiente foi centrifugada para obter cerca de 1-5x10^8 células totais. O grânulo resultante foi lavado com os meios de base sem adição de fonte de carbono fixo. As células foram novamente centrifugadas e o grânulo foi ressuspenso em volume de meios de base suficiente para obter 5 x 10^7 a 2 x 10^8 células/ml. 250-L000 µl de células foram então colocadas em placas em meios de base sólida suplementadas com 1% de sacarose e deixadas par secar sobre a placa em uma tampa estéril. O DNA plasmidial foi precipitado

sobre as partículas de ouro de acordo com as recomendações do fabricante (Seashell Technology, La Jolla, CA). As transformações foram realizadas utilizando um sistema de liberação de partículas BioRad Ele PDS-1000 utilizando discos de ruptura 1350 PSI com o conjunto macrocarregador fixado a 9 centímetros do suporte de disco de ruptura. Na sequência de transformações, as placas foram incubadas no escuro a 28°C. Todas as cepas geraram várias colônias transformantes. As placas de controle transformadas sem inserção de invertase, mas preparadas de outra maneira idêntica, não continham colônias.

Análise dos transformantes de Chlorella protothecoides: O DNA genômico foi extraído de células de Chlorella protothecoides do tipo selvagem e das colônias transformantes da seguinte forma: As células foram ressuspensas em 100 ul de tampão de extração (87,5 mM Tris Cl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0, SDS 0,25%) e incubadas a 60 ° C, com misturas ocasionais através de inversão, durante 30 minutos. Para a PCR, as amostras foram diluídas 1:100 em 20 mM Tris Cl, pH 8,0.

A genotipagem foi realizada em DNA genômico extraído de WT, transformantes e DNA plasmidial. As amostras foram genotipados para o gene marcador. Primers 2383 (5 'CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGC 3') (SEQ ID NO: 20) e 2279 (5 'CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG 3') (SEQ ID NO: 21) foram utilizados nesta genotipagem de PCR. O perfil de PCR utilizado foi a seguinte: desnaturação a 94ºC por 5 min, 35 ciclos de 94ºC-30 seg., 60ºC-30 seg., 72ºC -3 min; 72ºC -5 min. Uma banda de tamanho idêntico foi ampliado a partir dos controles positivos (plasmídeo) e dois transformantes de Chlorella protothecoides (UTEX 31), como mostrado na figura 27.

Análise da Chlorella minutissima e transformantes de Chlorella emersonii: O DNA genômico foi extraído de Chlorella WT e dos transformantes da seguinte forma: As células foram ressuspensas em 100 ul de tampão de extração (87,5 mM Tris Cl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0, SDS 0,25%) e incubadas a 60 ° C, com misturas ocasionais através de inversão, durante 30 minutos. Para a PCR, as amostras foram diluídas 1:100 em 20 mM Tris Cl, pH 8,0. A genotipagem foi realizada em DNA genômico extraído de WT, transformantes e DNA plasmidial. As amostras foram genotipados para o gene marcador. Primers 2336 (5' GTGGCCATATGGACTTACAA 3') (SEQ ID NO:22) e 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG 3') (SEQ ID NO:21) foram designados grupo de primer 2 (produto esperado 1215 bp), enquanto primers 2465 (5' CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG 3') (SEQ ID NO:23) e 2470 (5' CACCCGTCGTCATGTTCACGGAGCCCAGTGCG 3') (SEQ ID NO:24) foram designados grupo primer 4 (produto esperado 1442 bp). O perfil de PCR utilizado foi a seguinte: desnaturação a 94ºC por 2 min, 29 ciclos de 94ºC-30 seg., 60ºC-30 seg., 72ºC -1 min, 30 seg.; 72ºC-5 min. Um controle de plasmídeo contendo a invertase

secretada foi usado como um controle de PCR. Figura 28 mostra a transformação de espécies de microalgas Chlorella minutissima (UTEX 2341) e Chlorella emersonii (CCAP 211/15) com o gene codificando uma invertase secretada.

A seqüência da invertase construção corresponde a SEQ ID NO: 25.

EXEMPLO 24

Crescimento de cepas de algas, em comparação com S. cerevisiae sobre uma matéria-prima celulósica preparada com Celluclast

Cepas e Condições de cultura: As cepas de algas usadas neste estudo estão listadas na Tabela 14 abaixo, e foram cultivadas em meio de proteose com material celulósico fornecido exogenamente e, em alguns casos, carbono fixo adicional sob a forma de glicose. Vinte e quatro cepas de algas foram utilizadas neste estudo, incluindo os cinco gêneros diferentes englobando onze espécies diferentes de Chlorella, duas de Parachlorella e Prototheca, e um de cada Bracteococcus e Pseudochlorella. Saccharomyces cerevisiae (cepa PJ-69-4A) foi cultivada em meio YPD (por litro, 10g extrato de bacto levedura, 20g bacto peptona e 20g glicose). Ambas as algas e leveduras foram cultivadas em 28°C no escuro. O crescimento dessas cepas em meios de proteose no escuro na ausência de material celulósico de carbono ou outros adicionais fixos não ocorreu ou foi extremamente reduzido.

Liberação da glicose a partir de material celulósico via tratamento de despolimerização enzimática: O material de forragem de milho úmido e explodido foi elaborado pelo National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) pelo cozimento da forragem de milho em uma solução de 1,4% de ácido sulfúrico e pela desidratação da pasta fluida resultante. Usando um analisador de umidade Mettler Toledo, os sólidos secos na planta de milho úmido foram determinados a 24%. Uma amostra úmida de 100 g foi ressuspensa em água deionizada para um volume final de 420 ml e o pH foi ajustado para 4,8 com 10 N NaOH. Celluclast™ (Novozymes) (uma celulase) foi adicionado a uma concentração final de 4% e a pasta fluida resultante foi incubada com agitação a 50°C por 72 horas. O pH deste material foi então ajustado para 7,5 com NaOH (variação de volume desprezível), esterilizado por filtração através de um filtro 0,22um e armazenado a -20°C. A amostra foi reservada para determinação da concentração de glicose usando um kit baseado de hexoquinase de Sigma, conforme descrito abaixo.

Determinação da concentração de glicose liberada por tratamento de Celluclast de forragem de milho úmido: As concentrações de glicose foram determinadas pela utilização de Reagente de Ensaio de Glicose Sigma # G3293. As amostras, tratadas como descrito acima, foram diluídas 400 vezes e 40µl foi adicionada à reação. A preparação celulásica de forragem de milho foi determinada para conter aproximadamente 23 g/L de glicose.

Tabela 14. Cepas de algas cultivadas em matérias-primas celulósicas.

Gênero/ Espécies	Fonte/Cargo
Bracteococcus menor	UTEX 66
Chlorella ellipsoidea	SAG 2141
Chlorella kessleri	UTEX 1808
Chlorella kessleri	UTEX 397
Chlorella emersonii	CCAP 211/15
Chlorella luteoviridis	SAG 2133
Chlorella luteoviridis	SAG 2198
Chlorella luteoviridis	SAG 2214
Chlorella luteoviridis	UTEX 22
Bracteococcus medionucleatus	UTEX 1244
Chlorella minutissima	CCALA 20024
Chlorella minutissima	UTEX 2341
Chlorella ovalis	CCAP 211/21A
Chlorella protothecoides	CCAP 211/8d
Chlorella protothecoides	UTEX 250
Chlorella saccharophila	UTEX 2911
Chlorella sorokiniana	UTEX 1230
Chlorella sp.	SAG 241.80
Chlorella vulgaris	CCAP 211/11C
Parachlorella kessleri	SAG 12.80
Parachlorella kessleri	SAG 27.87
Prototheca moriformis	UTEX 1441
Prototheca moriformis	UTEX 1434
Pseudochlorella aquatica	SAG 2149

Na Tabela 14, e como aqui utilizado, UTEX refere-se à coleta de cultura de algas na Universidade do Texas (Austin, Texas, EUA), SAG refere-se à coleção de culturas de algas na Universidade de Göttingen (Göttingen, Alemanha), CCAP refere-se à coleta de cultura de algas e protozoários geridos pela Associação Escocesa de Ciências Marinhas (Escócia, Reino Unido) e CCALA refere-se à coleta de cultura de laboratório de algas no Instituto de Botânica (Třeboň, República Tcheca).

Determinação do crescimento sobre Material celulósico: Após o tratamento enzimático e a sacarificação de celulose em glicose, xilose e outros açúcares monossacarídeo, o material preparado acima foi avaliado como uma matéria-prima para o crescimento de 24 cepas de algas ou S. cerevisiae nos meios de proteose YPD respectivamente. O meio de proteose foi feito para uma concentração final de glicose de 23 g/L (concentração final de glicose gerada através do tratamento celulolítica de forragem de milho), como foi YPD para o crescimento de S. cerevisiae, através da adição de quantidades variáveis de glicose pura e/ou material celulósico despolimerizado. As concentrações variáveis de material celulósico foram incluídos, fornecendo 0, 12.5, 25, 50

e 100% dos 23 g/L de glicose em cada meio, os componentes dos quais são apresentados na Tabela 15 abaixo. Um ml do meio apropriado foi adicionado aos poços de 24 poços. S. cerevisiae, crescida de forma heterotrófica 28°C em YPD, serviu como inóculo (UL 20) para os poços de levedura. Vinte microlitros de inóculo para as 24 cepas de algas foram fornecidas por células de algas cultivadas mixotroficamente em meios proteose contendo 20 g/L de glicose.

Tabela 15. Preparações de matérias-primas celulósicas.

Vol. YPD de 23,1 g/ L de glicose (ml)	Vol. Media Proteose de 23,1 g/ L de glicose (ml)	Vol. de 100% Celulósico compensados para Meio de Proteose (ml)	Vol. de 100% Celulósico compensados para YPD (ml)	Volume Final (ml)	Percentual celulósico
0	1	0	0	1	0
0	0,875	0,125	0	1	12,5
0	0,75	0,25	0	1	25
0	0,5	0,5	0	1	50
0	0	1	0	1	100
1	0	0	0	1	0
0,875	0	0	0,125	1	12,5
0,75	0	0	0,25	1	25
0,5	0	0	0,5	1	50
0	0	0	1	1	100

A Tabela 15 mostra o volume modificado de forragem de milho despolimerizado para conter componentes de meio proteose ou YPD que foram adicionados ao meio proteose ou YPD, respectivamente, para produzir meios que contenham o percentual indicado de celulósico. Os meios foram elaborados de forma a obter uma concentração de glicose final de 23 g/L em todos os casos. O volume do meio anterior à adição de 20 µl de levedura crescida da fase log média ou de células de alga foi de 1 ml. As células foram incubadas dois dias no escuro nas variadas concentrações de fontes de celulose em 28°C com agitação (rpm 300). O crescimento foi avaliado pela medida da absorbância a 750nm em um espectrofotômetro UV. Surpreendentemente, todas as cepas cresceram no material celulósico preparado com Celluclast, incluindo condições de meios em que 100% de açúcares fermentáveis foram derivados de celulose.

EXEMPLO 25

Crescimento de 24 cepas de algas e S. cerevisiae em diferentes fontes de celulose preparadas com Accellerase 1000 ™ e Celluclast ™

Cepas e condições de cultura: Cepas de algas usadas neste exemplo estão listadas na Tabela 14 (acima) e foram cultivadas em carbono fixo acrescido de adicionais meio de

proteose na forma de material celulósico despolimerizado e/ou glicose pura. Saccharomyces cerevisiae (estirpe pJ69-4a) foi cultivada em meios YPD carbono fixo acrescido de adicionais na forma de material celulósico despolimerizado e/ou glicose pura. Ambas as algas e leveduras foram cultivadas em 28°C no escuro.

Liberação da glicose a partir de material celulósico via tratamento de despolimerização enzimática: O material de forragem de milho explodido e úmido foi elaborado pelo National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) pelo cozimento de forragem de milho em uma solução de 1,4% de ácido sulfúrico e de desidratação da pasta fluida resultante. A *Panicum virgatum* também foi elaborada pelo National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO), utilizando o mesmo método de forragem de milho. A polpa de beterraba, gerada através do tratamento de pectinase, foi fornecida pela Atlantic Biomass, Inc. de Frederick, MD. Usando um analisador de umidade Mettler Toledo, os sólidos secos foram de 24% nas forragens de milho úmido, 26% na *Panicum virgatum* e 3,5% na polpa de beterraba. Uma amostra de 100g de forragem de milho úmido ou de *Panicum virgatum* foi ressuspensa em água deionizada para um volume final de 420 ml e o pH ajustado para 4,8 com 10 N NaOH. Para a polpa de beterraba, 8,8 gramas de sólidos secos foram levados a 350 ml com água deionizada e o pH ajustado para 4,8 com NaOH 10N. Para todas as populações animais, Accellerase 1000™ (Genencor) (complexo de uma enzima celulase) foi utilizado na proporção de 0,25 ml de enzima por grama de biomassa seca. As amostras foram incubadas com agitação (110 rpm) a 50°C por 72 horas. O pH deste material foi então ajustado para 7,5 com NaOH (variação de volume desprezível), esterilizado por filtração através de um filtro 0,22um e usado em experimentos de crescimento descritos abaixo. A amostra foi reservada para determinação da concentração de glicose usando um kit baseado em hexoquinase da Sigma, conforme descrito abaixo. O mesmo conjunto de fontes de celulose também foi preparado usando Celluclast™ (Novozymes) (celulase um), conforme descrito no exemplo anterior.

Determinação das concentrações de glicose em várias fontes de celulose tratadas com Accellerase 1000: As concentrações de glicose foram determinadas utilizando o Reagente de ensaio de glicose Sigma # G3293. As amostras, tratadas como descrito acima, foram diluídas 400 vezes e 40ul foi adicionada à reação. As preparações de celulose de forragem de milho, *Panicum virgatum* e polpa de beterraba foram determinadas para conter cerca de 23,6, 17,1 e 13,7 g/L de glicose, respectivamente.

Determinação do crescimento em Material celulósico: Depois da despolimerização enzimática de fontes de celulose para glicose, xilose e outros monossacarídeos, os materiais preparados anteriormente foram avaliados como matérias-primas para o crescimento das 24 cepas de algas na Tabela 14 e S. cerevisiae em meios de proteose ou

YPD, respectivamente. Os meios foram concebidos para conter uma concentração de glicose consistente durante a variação da quantidade de material celulósico derivado de forragem de milho, *Panicum virgatum* ou polpa de beterraba. Um primeiro conjunto de meio de protease e YPD continha 23,6 g/L de glicose pura, enquanto um segundo conjunto de meios despolimerizados continha forragem de milho, *Panicum virgatum* e polpa de beterraba, cada uma das quais continha 23,6 g/L de glicose. Os meios de *Panicum virgatum* e de polpa de beterraba foram suplementados com 6,5 e 9,9 g/L de glicose pura para normalizar a glicose em todos os meios de celulose em 23,6 g/L. Um ml do meio apropriado foi adicionado aos poços de 24 poços. S. cerevisiae, crescidas heterotroficamente a 28°C em YPD serviu como inóculo (20 ul) para os poços de levedura. Vinte microlitros de inóculo para as 24 cepas de algas foram fornecidas por células de algas que cresceram mixotroficamente em meios de protease contendo 20 g/L de glicose. Todas as células foram incubadas dois dias no escuro nas variadas concentrações de fontes de celulose a 28°C com agitação (300 rpm). O crescimento foi avaliado pela medida da absorbância a 750nm em um espectrofotômetro UV. Surpreendentemente, todas as cepas cresceram no material de forragem de milho, *Panicum virgatum* e polpa de beterraba preparados com Accellerase 1000™ ou Celluclast™, incluindo condições de meios em que 100% de açúcares fermentáveis foram derivados de celulose. Sob nenhuma combinação de matérias-primas celulósicas e enzimas despolimerização, S. cerevisiae superou crescimento em uma quantidade equivalente de glicose pura, indicando que os inibidores do crescimento da levedura no material celulósico causaram um grande impacto sobre a produtividade da fermentação. As combinações de cepas de algas, enzimas de despolimerização e matérias-primas com 100% de monossacarídeos derivados de celulósicos que superaram 100% de glicose pura são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Combinações de algas, enzimas e matérias-primas.

Matéria-prima e despolimerização enzimática	Gênero/Espécie	Fonte/ Cargo
forragem de milho/celluclastTM	Bracteococcus minor	UTEX 66
polpa de beterraba/ accelleraseTM	Chlorella ellipsoidea	SAG 2141
Panicum virgatum/ accelleraseTM	Chlorella kessleri	UTEX 252
polpa de beterraba/ accelleraseTM	Chlorella kessleri	UTEX 397
Panicum virgatum/ accelleraseTM	Chlorella luteoviridis	SAG 2133
polpa de beterraba/ accelleraseTM	Chlorella luteoviridis	SAG 2133

Panicum virgatum/ accelleraseTM	Chlorella luteoviridis	UTEX 22
polpa de beterraba/ accelleraseTM	Chlorella luteoviridis	UTEX 22
forragem de milho/ accelleraseTM	Chlorella luteoviridis	UTEX 22
polpa de beterraba/ accelleraseTM	Chlorella protothecoides	UTEX 250
polpa de beterraba/ accelleraseTM	Chlorella sp.	SAG 241.80
polpa de beterraba/ accelleraseTM	Parachlorella kessleri	SAG 12.80
Panicum virgatum/ accelleraseTM	Prototheca moriformis	UTEX 1441
polpa de beterraba/ accelleraseTM	Prototheca moriformis	UTEX 1441
forragem de milho/ accelleraseTM	Prototheca moriformis	UTEX 1441
forragem de milho/ celluclastTM	Prototheca moriformis	UTEX 1441
forragem de milho/accelleraseTM	Prototheca moriformis	UTEX 1434
polpa de beterraba/ accelleraseTM	Pseudochlorella aquatica	SAG 2149

EXEMPLO 26

Telas de Utilização de carbono

Cepas e condições de cultura: As sementes das culturas de várias cepas de microalgas identificadas a seguir, foram iniciadas em 1 ml de culturas líquidas em 24 poços e cultivadas autotroficamente por 48 horas na luz, agitando a ~ 350 rpm. As placas foram preparadas com 1,5% de meio de proteose sólida baseada em agarose contendo 1% de glicose, glicerol, xilose, sacarose, frutose, arabinose, manose, galactose, ou acetato como única fonte de carbono fixo. Para cada cepa, 5µl da cultura de 24 poços autotróficos foram manchadas para o meio sólido. As placas foram incubadas por 7 dias no escuro a 28°C e examinadas para o crescimento em relação a uma placa de controle que não contém carbono adicional fixo. O crescimento foi observado para cada uma das espécies testadas com cada matéria-prima respectiva, como mostra abaixo a Tabela 17. O crescimento dessas cepas em meios de proteose no escuro na ausência de carbono fixo adicional ou não ocorreu ou foi extremamente reduzido.

Tabela 17. Espécies de algas cultivadas em várias matérias-primas de carbono fixo.

Fonte de carbono fixo	Gênero/Espécie	Fonte/ Cargo
Glicose	Chlorella rotothecoides	UTEX 250
Glicose	Chlorella kessleri	UTEX 397
Glicose	Chlorella sorokiniana	UTEX 2805
Glicose	Parachlorella kessleri	SAG 12.80
Glicose	Pseudochlorella aquatica	SAG 2149
Glicose	Chlorella reisiglii	CCAP 11/8
Glicose	Bracteococcus medionucleatus	UTEX 1244
Glicose	Prototheca stagnora	UTEX 1442
Glicose	Prototheca moriformis	UTEX 1434
Glicose	Prototheca moriformis	UTEX 1435
Glicose	Scenedesmus rubescens	CCAP 232/1
Glicerol	Parachlorella kessleri	SAG 12.80
Glicerol	Chlorella protothecoides	CCAP 211/8d
Glicerol	Bracteococcus medionucleatus	UTEX 1244
Glicerol	Prototheca moriformis	UTEX 288
Glicerol	Prototheca moriformis	UTEX 1435
Glicerol	Chlorella minutissima	UTEX 2341
Glicerol	Chlorella sp.	CCAP 211/61
Glicerol	Chlorella sorokiniana	UTEX 1663
Xilose	Chlorella luteoviridis	SAG 2133
Xilose	Chlorella ellipsoidea	SAG 2141
Xilose	Pseudochlorella aquatica	SAG 2149
Xilose	Chlorella sp.	CCAP 211/75
Xilose	Prototheca moriformis	UTEX 1441
Xilose	Prototheca moriformis	UTEX 1435
Sacarose	Chlorella saccharophila	UTEX 2469
Sacarose	Chlorella luteoviridis	UTEX 22
Sacarose	Chlorella sp.	UTEX EE102
Sacarose	Chlorella luteoviridis	SAG 2198
Sacarose	Bracteococcus medionucleatus	UTEX 1244
Sacarose	Chlorella minutissima	CCALA 20024
Frutose	Chlorella kessleri	UTEX 398
Frutose	Chlorella trebouxiodes	SAG 3.95
Frutose	Parachlorella kessleri	SAG 27.87
Frutose	Chlorella luteoviridis	SAG 2214
Frutose	Chlorella protothecoides	UTEX 31
Frutose	Chlorella protothecoides	UTEX 250
Frutose	Chlorella reisiglii	CCAP 11/8
Frutose	Chlorella protothecoides	CCAP 211/8d
Frutose	Prototheca moriformis	UTEX 1435
Frutose	Scenedesmus rubescens	CCAP 232/1
Arabinose	Chlorella sp.	CCAP 211/75
Manose	Chlorella kessleri	UTEX 263
Manose	Chlorella saccharophila	UTEX 2911
Manose	Parachlorella kessleri	SAG 12.80

Manose	Chlorella sp.	SAG 241.80
Manose	Chlorella angustoellipsoidea	SAG 265
Manose	Chlorella ellipsoidea	SAG 2141
Manose	Chlorella prototheccoides	UTEX 250
Manose	Chlorella emersonii	CCAP 211/15
Manose	Bracteococcus minor	UTEX 66
Manose	Prototheca stagnora	UTEX 1442
Manose	Prototheca moriformis	UTEX 1439
Manose	Chlorella cf. minutissima	CCALA 20024
Manose	Scenedesmus rubescens	CCAP 232/1
Galactose	Bracteococcus minor	UTEX 66
Galactose	Parachlorella kessleri	SAG 14.82
Galactose	Parachlorella beijerinckii	SAG 2046
Galactose	Chlorella prototheccoides	UTEX 25
Galactose	Chlorella sorokiniana	UTEX 1602
Galactose	Parachlorella kessleri	SAG 12.80
Galactose	Pseudochlorella aquatica	SAG 2149
Galactose	Chlorella luteoviridis	SAG 2214
Galactose	Chlorella ellipsoidea	CCAP 211/42
Galactose	Chlorella ellipsoidea	CCAP 211/50
Galactose	Chlorella prototheccoides	UTEX 250
Galactose	Chlorella prototheccoides	UTEX 264
Galactose	Bracteococcus medionucleatus	UTEX 1244
Galactose	Prototheca moriformis	UTEX 1439
Galactose	Prototheca moriformis	UTEX 1441
Galactose	Chlorella kessleri	CCALA 252
Acetato	Chlorella sorokiniana	UTEX 1230
Acetato	Chlorella sorokiniana	UTEX 1810
Acetato	Chlorella luteoviridis	UTEX 22
Acetato	Parachlorella kessleri	SAG 12.80
Acetato	Parachlorella kessleri	SAG 27.87
Acetato	Chlorella sp.	SAG 241.80
Acetato	Chlorella luteoviridis	SAG 2214
Acetato	Chlorella prototheccoides	UTEX 31
Acetato	Chlorella prototheccoides	UTEX 411
Acetato	Chlorella ellipsoidea	CCAP 211/42
Acetato	Chlorella ovalis	CCAP 211/21A
Acetato	Chlorella prototheccoides	CCAP 211/8d
Acetato	Prototheca stagnora	UTEX 1442
Acetato	Chlorella prototheccoides	UTEX 250
Acetato	Chlorella sorokiniana	CCALA 260
Acetato	Chlorella vulgaris	CCAP 211/79
Acetato	Parachlorella kessleri	SAG 14.82

EXEMPLO 27

Produção de Diesel Renovável

Produção de Célula: Um lote F-Tank de Chlorella protothecoides (UTEX 250) (cerca de 1.200 litros) foi utilizado para gerar biomassa para processos de extração. O lote (# ZA07126) foi autorizado a funcionar por 100 horas, durante o controle dos níveis de glicose em 16 g/L, depois que o tempo de alimentação do xarope de milho foi encerrado. Os níveis de glicose residuais caíram para <0 g/L, duas horas depois. Isto resultou em uma idade final de 102 horas. O volume do caldo final foi de 4.239,65 litros. Ambas as verificações contaminação do processo e uma análise minuciosa de uma amostra de caldo final não mostrou quaisquer sinais de contaminação. O caldo fermentado foi centrifugado e secado em tabor. A células secadas em tambor foram ressuspensas em hexano e homogeneizados em cerca de 1000 bar. A extração de hexano foi então realizada utilizando métodos padronizados, e o óleo de triglicerídeos de algas resultante foi determinado a ser livre de hexano residual.

Produção de Diesel Renovável O óleo de triglicérides de algas tinha um perfil lipídico de cerca de 3% C18:0,71% C18:1, 15% C18:2,1% C18:3,8% C16:0 e 2% de outros componentes. O óleo foi primeiro submetido a hidrocraqueamento, resultando em uma perda de rendimento aproximado de 20% de água e gases. A hidroisomerização foi então realizada, com uma perda de aproximadamente 10% na produção de gases. A primeira destilação, em seguida, foi realizada para remover a fração nafta, deixando o produto desejado. Cerca de 20% do material foi perdido para a nafta na primeira destilação. A segunda destilação foi então realizada a uma temperatura suficiente para eliminar frações necessárias para satisfazer as especificações ASTM D975, mas deixam uma fração de fundo que não chegaram ao ponto de 90% para uma destilação D975. Cerca de 30% do material foi deixado na fração inferior na segunda destilação. O material resultante foi então testado para todas as especificações ASTM D975.

As figuras 29 e 30 ilustram um cromatógrafo a gás e um lote de distribuição de ebulição, respectivamente, do produto diesel renovável final produzido pelo método da invenção. A tabela 18 mostra a distribuição ponto de ebulição do produto diesel renovável resultante, e a Tabela 19 mostra os resultados de uma análise do produto final para o cumprimento das especificações ASTM D975.

Tabela 18. Ebulição ponto de distribuição de produtos dieselenovável.

% Massa recuperada	BP °C	% Massa recuperada	BP °C	% Massa recuperada	BP °C	% Massa recuperada	BP °C
IBP	150.4	26.0	261.8	52.0	303.8	78.0	315.8
1.0	163.6	27.0	264.6	53.0	304.4	79.0	316.4
2.0	173.4	28.0	266.2	54.0	304.8	80.0	317.0
3.0	175.2	29.0	268.2	55.0	305.2	81.0	317.6
4.0	188.0	30.0	271.0	56.0	305.6	82.0	318.4
5.0	194.8	31.0	272.4	57.0	306.0	83.0	319.0
6.0	196.6	32.0	273.4	58.0	306.4	84.0	319.6
7.0	197.8	33.0	276.2	59.0	306.6	85.0	320.2
8.0	207.4	34.0	280.0	60.0	307.0	86.0	320.8
9.0	210.0	35.0	282.4	61.0	307.4	87.0	321.2
10.0	214.4	36.0	285.2	62.0	307.6	88.0	321.8
11.0	216.6	37.0	287.8	63.0	308.0	89.0	322.2
12.0	217.6	38.0	289.6	64.0	308.4	90.0	322.4
13.0	221.4	39.0	291.8	65.0	308.8	91.0	322.8
14.0	227.6	40.0	294.2	66.0	309.2	92.0	323.2
15.0	229.8	41.0	295.8	67.0	309.6	93.0	324.4
16.0	233.2	42.0	296.8	68.0	310.2	94.0	326.8
17.0	235.8	43.0	297.6	69.0	310.6	95.0	329.4
18.0	236.8	44.0	298.4	70.0	311.2	96.0	333.6
19.0	240.2	45.0	299.2	71.0	311.6	97.0	339.4
20.0	245.6	46.0	299.8	72.0	312.2	98.0	346.2
21.0	248.0	47.0	300.6	73.0	313.0	99.0	362.8
22.0	250.2	48.0	301.2	74.0	313.6	FBP	401.4
23.0	253.6	49.0	302.0	75.0	314.2		
24.0	255.2	50.0	302.6	76.0	314.8		
25.0	256.8	51.0	303.2	77.0	315.4		

Tabela 19. Relatório Analítico de produto diesel renovável por meio de especificações D975.

Número do Método	Descrição do Teste	Resultados	Unidades
D93A	Ponto de Fusão (PMCC)	70	°C
D2709	Água e Sedimento	0	Vol. %
D86	Destilação 90% (Recuperada)	301,0/573,9	°C/°F
D445	Viscosidade Cinemática a 40,0°C (104,0°F)	2,868	Mm2/seg.
D482	Cinza	<0,001	Wt%
D6453	Sulfur	2,4	ppm
D130	Corrosão de Cobre 3 horas a 50°C	1b	
D613	Número de Cetano ***	>65	
D976	Índice de Cetano calculado	71,2	
D2500	Ponto de Névoa	-3	°C
D524	Resíduo de Carbono 10% Ramsbottom	0,02	Wt %
D97	Ponto de derramamento	-3	°C
D2274	Insolúveis totais de teste de 40h***	4,0	mg/100ml
D4052	Densidade a 15,0°C (59,0°F)	793,8	Kg/m³
D4176-1	Aparência por inspeção visual (Lab)	Claro e luminoso – aprovado	Visual
D4176-1	Aparência por inspeção visual (Lab)	Livre de água – aprovado	Visual
D4176-1	Aparência por inspeção visual (Lab)	Particulado - aprovado	Visual
D1500	Cor ASTM	L 0,5	
D664	Número do ácido	<0,10	Mg KOH/g
D6079	Lubricidade (marca de desgaste)	405	µm

SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO:1

Promotor HUP de Chlorella (subseqüência do GenBank número de acesso X55349):

gatcagacgggcctgacctgcgagataatcaagtgctcgtaggcaaccaactcagcagctgcttggtgttgggtctgca
ggatagtgttgcagggccccaaggacagcagggggaacttacaccttgtccccgaccccagttttatggagtgcattgcctcaagagcc
tagccggagcgctaggctacatacttgccgcaccggtatgaggggatatagtactcgcactgcgctgtctagtgagatgggcagt
gctgcccataaacaactggctgctcagccatttgttggcggaccattctgggggggccagcaatgcctgactttcgggtagggtga
aaactgaacaaagactaccaaaacagaaatttcttcctccttggaggtaagcgcaggccggccccgcctgcgccacatggcgctcc
gaacacctccatagctgtaagggcgcaaacatggccggactgttgtcagcactctttcatggccatacaaggtcatgtcgagattag
tgctgagtaagacactatcaccccatgttcgattgaagccgtgacttcatgccaacctgccccctgggcgtagcagacgtatgccatc
atgaccactagccgacatgcgctgtcttttgccaccaaaacaactggtacaccgctcgaagtcgtgccgcacaccttccgggagtg
agtccggcgactcctccccggcgggccgcggccctaccctgggtagggtcgccataccgcccacgaccaaacgacgcaggagg
ggattgggggtagggaatcccaaccagcctaaccaagacggcacctataataatagggtgggggactaacagccctatatcgcaa
gctttgggtgcctatcttgagaagcacgagttggagtggctgtgtacggtcgaccctaaggtgggtgtgccgcagcctgaaacaaa

gcgtctagcagctgcttctataatgtgtcagccgttgtgtttcagttatattgtatgctattgtttgttcgtgctagggtggcgcaggccc
acctactgtggcgggccattggttggtgcttgaattgcctcaccatctaaggtctgaacgctcactcaaacgcctttgtacaactgca
gaactttccttggcgctgcaactacagtgtgcaaaccagcacatagcactcccttacatcacccagcagtacaaca

SEQ ID NO:2

Nitrato redutase promotor de Chlorella ellipsoidea partir de AY307383:

cgctgcgcaccagggccgccagctcgctgatgtcgctccaaatgcggtcccccgatttttgttcttcatcttctccaccttt
ggtggccttcttggccagggccttcagctgcatgcgcacagaccgttgagctcctgatcagcatcctcaggaggccctttgacaag
caagccccctgtgcaagccccattcacggggtaccagtggtgctgaggtagatgggtttgaaaaggattgctcggtcgattgctgctc
atggaattggcatgtgcatgcatgttcacaatatgccaccaggctttggagcaagagagcatgaatgccttcaggcaggttgaaagt
tcctgggggtgaagaggcagggccgaggattggaggaggaaagcatcaagtcgtcgctcatgctcatgttttcagtcagagtttgc
caagctcacaggagcagagacaagactggctgctcaggtgttgcatcgtgtgtgtggtgggggggggggggttaatacggtacg
aaatgcacttggaattcccacctcatgccagcggacccacatgcttgaattcgaggcctgtgggggtgagaaatgctcactctgccct
cgttgctgaggtacttcaggccgctgagctcaaagtcgatgccctgctcgtctatcagggcctgcacctctgggctgaccggctca
gcctccttcgcgggcatggagtaggcgccggcagcgttcatgtccgggcccagggcagcggtggtgccataaatgtcggtgatg
gtgggggaggggggccgtcgccacaccattgccgttgctggctgacgcatgcacatgtggcctggctggcaccggcagcactgg
tctccagccagccagcaagtggctgttcaggaaagcggccatgttgttggtccctgcgcatgtaatttcccagatcaaaggagggga
acagcttggatttgatgtagtgcccaaccggactgaatgtgcgatggcaggtccctttgagtctcccgaattactagcagggcactg
tgacctaacgcagcatgccaaccgcaaaaaaatgattgacagaaaatgaagcggtgtgtcaatatttgctgtatttattcgttttaatca
gcaaccaagttcgaaacgcaactatcgtggtgatcaagtgaacctcatcagacttacctcgtttggcaaggaaacggaggcacca
aattccaatttgatattatcgcttgccaagctagagctgatctttgggaaaccaactgccagacagtggactgtgatggagtgccccg
ggtggtggagcctcttcgattcggttagtcattactaacgtgaaccctcagtgagggaccatcagaccagaaagaccagatctcct
cctcgacaccgagagagtgttgcggcagtaggacgacaag

SEQ ID NO:3

B. braunii 5'UTR malato desidrogenase:

aattggaaaccccgcgcaagacgggttgtttggccgcctgaccggaaaggggggggcctgtcccgaaggggtctat
ctcttgggggatgtcgggcgcggaaagtcgatgttgatggaccctcttcttcgaccatgtcggggtcgaggccaagagccgcgtcc
atttcgccgagttcatgatggaggtgaatgaccgcatcgccaccgaacgcgccaagaagcgggcgaccgatcgccccccgtcgct
gcagccttgccgaggaagtccggctgctggcgttcgacgagatgatggtgacgaacagccccggacgcgatgatcctgtcgcg
gctgttcaccgcgctgatcgaggcgggggtgacgatcgtcaccacctccaaccggccgcccagggatctctataagaacgggct
caaccgcgagcatttcctgccctttatcgcgctgatcgaggcgcggctggacgtgctggcgctgaaacggcccgaccgactatcg
gcgcgaccggctgggcggctggacacgtggttggtgcccaatggccccaaggcgacgattaccttgtcggcggcgttcttccg
cctgaccgactatccggtcgaggatgccgcgcatgtgcctctgaggacctgaaggtgggcgggcgcgtgctgaatgtccccaa
ggcgctgaagggcgtcgcggtcttctcgttcaagcggttgtgcgggcgaagcgcgggggggcggcggactatctggcggtcgcgc
ggggcttccacaccgtcatcctggtcggaatccccaagctgggggcggagaaccgcaacgaggcgggggcgcttcgtccagctg
atcgacgcgctctacgaacataaggtcaagctgctcgccgcagccgatgccagccgccgaactctatgaaaccggcgacggc
cggttcgagtttgagcgcagatcagccggttggaagagatgcgctccgaggattatctggccccaaggccatggctcggaggggc

cttgatcaggccttaatgcacttcgcaaccattatcgtttaaaatcttaaactctgtggaataacggttcccccgacgccgcaatacacg
tacgtccactacggagtaggattgga

SEQ ID NO:4

Promotor RBCS2 de Chlamydomonas:

cgcttagaagatttcgataaggcgccagaaggagcgcagccaaaccaggatgatgtttgatggggtatttgagcacttg
caacccttatccggaagccccctggcccacaaaggctaggcgccaatgcaagcagttcgcatgcagcccctggagcggtgccct
cctgataaaccggccaggggggcctatgttctttacttttttacaagagaagtcactcaacatcttaaacggtcttaagaagtctatccg
g

SEQ ID NO:5

CMV-Hyg-CMV BamHI-SacII cassete a partir de pCAMBIA:

ggatccccgggaattcggcgcgccgggcccaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagat
acagtctcagaagaccaaagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatct
gtcacttcatcaaaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagat
gcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttca
aagcaagtggattgatgtgataacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagacca
aagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaagg
acagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtg
gtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgat
gtgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagacccttcctctatataaggaagttcatttcatttgga
gaggacacgctgaaatcaccagtctctctctacaaatctatctctctcgagctttcgcagatcccggggggcaatgagatatgaaaa
agcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaagtttctgatcgaaaagttcgacagcgtctccgacctgatgcagctctcggagggc
gaagaatctcgtgctttcagcttcgatgtaggagggcgtggatatgtcctgcgggtaaatagctgcgccgatggtttctacaaagatc
gttatgtttatcggcactttgcatcggccgcgctcccgattccggaagtgcttgacattggggagtttagcgagagcctgacctattg
catctcccgccgtgcacagggtgtcacgttgcaagacctgcctgaaaccgaactgcccgctgttctacaaccggtcgcggaggcct
atggatgcgatcgctgcggccgatcttagccagacgagcgggttcggcccattcggaccgcaaggaatcggtcaatacactacat
ggcgtgatttcatatgcgcgattgctgatccccatgtgtatcactggcaaactgtgatggacgacaccgtcagtgcgtccgtcgcgc
aggctctcgatgagctgatgctttgggccgaggactgccccgaagtccggcacctcgtgcacgcggatttcggctccaacaatgt
cctgacggacaatggccgcataacagcggtcattgactggagcgaggcgatgttcggggattcccaatacgaggtcgccaacat
cttcttctggaggccgtggttggcttgtatggagcagcagacgcgctacttcgagcggaggcatccggagcttgcaggatcgcca
cgactccgggcgtatatgctccgcattggtcttgaccaactctatcagagcttggttgacggcaatttcgatgatgcagcttgggcgc
agggtcgatgcgacgcaatcgtccgatccggagccgggactgtcgggcgtacacaaatcgcccgcagaagcgcggccgtctg
gaccgatggctgtgtagaagtactcgccgatagtggaaaccgacgccccagcactcgtccgagggcaaagaaatagagtagatg
ccgaccggatctgtcgatcgacaagctcgagtttctccataataatgtgtgagtagttcccagataagggaattagggttcctatagg
gtttcgctcatgtgttgagcatataagaaacccttagtatgtatttgtatttgtaaaatacttctatcaataaaatttctaattcctaaaacca
aaatccagtactaaaatccagatcccccgaattaattcggcgttaattcagtacattaaaaacgtccgcaatgtgttattaagttgtcta
agcgtcaatttgtttacaccacaatatatcctgccaccagccagccaacagctccccgaccggcagctcggcacaaaatcaccact

cgatacaggcagcccatcagtccgggacggcgtcagcgggagaggcgttgtaaggcggcagacttgctcatgttaccgatgct
attcggaagaacggcaactaagctgccgggtttgaaacacggatgatctcgcggagggtagcatgttgattgtaacgatgacaga
gcgttgctgcctgtgatcaccgcgg

SEQ ID NO:6

caaccacgtcttcaaagcaa

SEQ ID NO:7

agcaatcgcgcatatgaaat

SEQ ID NO:8

ATGCTTCTTCAGGCCTTTCTTTTTCTTCTTGCTGGTTTTGCTGCCAAGATC
AGCGCCTCTATGACGAACGAAACCTCGGATAGACCACTTGTGCACTTTACACC
AAACAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACGAAAAAGAT
GCCAAGTGGCATCTGTACTTTCAATACAACCCGAACGATACTGTCTGGGGGAC
GCCATTGTTTTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAATTGGGAGGACC
AACCAATAGCTATCGCTCCGAAGAGGAACGACTCCGGAGCATTCTCGGGTTCC
ATGGTGGTTGACTACAACAATACTTCCGGCTTTTTCAACGATACCATTGACCCG
AGACAACGCTGCGTGGCCATATGGACTTACAACACACCGGAGTCCGAGGAGC
AGTACATCTCGTATAGCCTGGACGGTGGATACACTTTTACAGAGTATCAGAAG
AACCCTGTGCTTGCTGCAAATTCGACTCAGTTCCGAGATCCGAAGGTCTTTTGG
TACGAGCCCTCGCAGAAGTGGATCATGACAGCGGCAAAGTCACAGGACTACA
AGATCGAAATTTACTCGTCTGACGACCTTAAATCCTGGAAGCTCGAATCCGCG
TTCGCAAACGAGGGCTTTCTCGGCTACCAATACGAATGCCCAGGCCTGATAGA
GGTCCCAACAGAGCAAGATCCCAGCAAGTCCTACTGGGTGATGTTTATTTCCA
TTAATCCAGGAGCACCGGCAGGAGGTTCTTTTAATCAGTACTTCGTCGGAAGC
TTTAACGGAACTCATTTCGAGGCATTTGATAACCAATCAAGAGTAGTTGATTTT
GGAAAGGACTACTATGCCCTGCAGACTTTCTTCAATACTGACCCGACCTATGG
GAGCGCTCTTGGCATTGCGTGGGCTTCTAACTGGGAGTATTCCGCATTCGTTCC
TACAAACCCTTGGAGGTCCTCCATGTCGCTCGTGAGGAAATTCTCTCTCAACAC
TGAGTACCAGGCCAACCCCGGAAACCGAACTCATAAACCTGAAAGCCGAACCG
ATCCTGAACATTAGCAACGCTGGCCCCTGGAGCCGGTTTGCAACCAACACCAC
GTTGACGAAAGCCAACAGCTACAACGTCGATCTTTCGAATAGCACCGGTACAC
TTGAATTTGAACTGGTGTATGCCGTCAATACCACCCAAACGATCTCGAAGTCG
GTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTTAAAGGCCTGGAAGACCCCGAGGAGTA
CCTCAGAATGGGTTTCGAGGTTTCTGCGTCCTCCTTCTTCCTTGATCGCGGGAA
CAGCAAAGTAAAATTTGTTAAGGAGAACCCATATTTTACCAACAGGATGAGCG
TTAACAACCAACCATTCAAGAGCGAAAACGACCTGTCGTACTACAAAGTGTAT
GGTTTGCTTGATCAAAATATCCTGGAACTCTACTTCAACGATGGTGATGTCGTG

TCCACCAACACATACTTCATGACAACCGGGAACGCACTGGGCTCCGTGAACAT
GACGACGGGTGTGGATAACCTGTTCTACATCGACAAATTCCAGGTGAGGGAAG
TCAAGTGA

SEQ ID NO:9

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

SEQ ID NO:10

TTGTCGGAATGTCATATCAA

SEQ ID NO:11

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

SEQ ID NO:12

AACGCCTTTGTACAACTGCA

SEQ ID NO:13

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

SEQ ID NO:14

MTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEKDAKWHLYFQYNPNDTVW
GTPLFWGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFSGSMVVDYNNTSGFFNDTIDP
RQRCVAIWTYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFWYE
PSQKWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPGLIEVPTEQ
DPSKSYWVMFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYYAL
QTFFNTDPTYGSALGIAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPET
ELINLKAEPILNISNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQ
TISKSVFADLSLWFKGLEDPEEYLRMGFEVSASSFFLDRGNSKVKFVKENPYFTNR
MSVNNQPFKSENDLSYYKVYGLLDQNILELYFNDGDVVSTNTYFMTTGNALGSV
NMTTGVDNLFYIDKFQVREVK

SEQ ID NO:15

MLLQAFLFLLAGFAAKISAS

SEQ ID NO:16

MANKSLLLLLLLGSLASG

SEQ ID NO:17

MARLPLAALG

SEQ ID NO:18

MANKLLLLLLLLLPLAASG

SEQ ID NO:19

MLLQAFLFLLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDE
KDAKWHLYFQYNPNDTVWGTPLFWGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFSG
SMVVDYNNTSGFFNDTIDPRQRCVAIWTYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNP

VLAANSTQFRDPKVFWYEPSQKWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANE
GFLGYQYECPGLIEVPTEQDPSKSYWVMFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFE
AFDNQSRVVDFGKDYYALQTFFNTDPTYGSALGIAWASNWEYSAFVPTNPWRSS
MSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILNISNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVD
LSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFKGLEDPEEYLRMGFEVSASSFFL
DRGNSKVKFVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYYKVYGLLDQNILELYFNDG
DVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVREVK

SEQ ID NO:20

CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGC

SEQ ID NO:21

CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCG

SEQ ID NO:22

GTGGCCATATGGACTTACAA

SEQ ID NO:23

CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG

SEQ ID NO:24

CACCCGTCGTCATGTTCACGGAGCCCAGTGCG

SEQ ID NO:25

gaattccccaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaggacagtagaaaaggaaggtggctacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtctcagaagaccaaagggctattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcacttcatcaaaggacagtagaaaaggaaggtggctacctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagacccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacacgctgaaatcaccagtctctctctacaaatctatctctggcgcgccatatcaATGCTTCTTCAGGCCTTTCTTTTTCTTCTTGCTGGTTTTGCTGCCAAGATCAGCGCCTCTATGACGAACGAAACCTCGGATAGACCACTTGTGCACTTTACACCAAACAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACGAAAAAGATGCCAAGTGGCATCTGTACTTTCAATACAACCCGAACGATACTGTCTGGGGGACGCCATTGTTTTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAATTGGGAGGACCAACCAATAGCTATCGCTCCGAAGAGGAACGACTCCGGAGCATTCTCGGGTTCCATGGTGGTTGACTACAACAATACTTCCGGCTTTTTCAACGATACCATTGACCCGAGACAACGCTGCGTGGCCATATGGACTTACAACACACCCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCGTATAGCCTGGACGGTGGATACACTTT

TACAGAGTATCAGAAGAACCCTGTGCTTGCTGCAAATTCGACTCAGTTCCGAG
ATCCGAAGGTCTTTTGGTACGAGCCCTCGCAGAAGTGGATCATGACAGCGGCA
AAGTCACAGGACTACAAGATCGAAATTTACTCGTCTGACGACCTTAAATCCTG
GAAGCTCGAATCCGCGTTCGCAAACGAGGGCTTTCTCGGCTACCAATACGAAT
GCCCAGGCCTGATAGAGGTCCCAACAGAGCAAGATCCCAGCAAGTCCTACTGG
GTGATGTTTATTTCCATTAATCCAGGAGCACCGGCAGGAGGTTCTTTTAATCAG
TACTTCGTCGGAAGCTTTAACGGAACTCATTTCGAGGCATTTGATAACCAATCA
AGAGTAGTTGATTTTGGAAAGGACTACTATGCCCTGCAGACTTTCTTCAATACT
GACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGCATTGCGTGGGCTTCTAACTGGGAGTA
TTCCGCATTCGTTCCTACAAACCCTTGGAGGTCCTCCATGTCGCTCGTGAGGAA
ATTCTCTCTCAACACTGAGTACCAGGCCAACCCGGAAACCGAACTCATAAACC
TGAAAGCCGAACCGATCCTGAACATTAGCAACGCTGGCCCCTGGAGCCGGTTT
GCAACCAACACCACGTTGACGAAAGCCAACAGCTACAACGTCGATCTTTCGAA
TAGCACCGGTACACTTGAATTTGAACTGGTGTATGCCGTCAATACCACCCAAA
CGATCTCGAAGTCGGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTTAAAGGCCTGGAAG
ACCCCGAGGAGTACCTCAGAATGGGTTTCGAGGTTTCTGCGTCCTCCTTCTTCC
TTGATCGCGGGAACAGCAAAGTAAAATTTGTTAAGGAGAACCCATATTTTACC
AACAGGATGAGCGTTAACAACCAACCATTCAAGAGCGAAAACGACCTGTCGT
ACTACAAAGTGTATGGTTTGCTTGATCAAAATATCCTGGAACTCTACTTCAACG
ATGGTGATGTCGTGTCCACCAACACATACTTCATGACAACCGGGAACGCACTG
GGCTCCGTGAACATGACGACGGGTGTGGATAACCTGTTCTACATCGACAAATT
CCAGGTGAGGGAAGTCAAGTGAgatctgtcgatcgacaagctcgagtttctccataataatgtgtgagtagttc
ccagataagggaattagggttcctatagggtttcgctcatgtgttgagcatataagaaacccttagtatgtatttgtatttgtaaaatacttt
ctatcaataaaatttctaattcctaaaaccaaaatccagtactaaaatccagatcccccgaattta

REIVINDICAÇÕES

1. Método de produção de lipídios microbianos **caracterizado** pelo fato de compreender o cultivo de uma população de micro-organismos selecionados do grupo que consiste em microalgas, leveduras oleaginosas e fungos, na presença de uma fonte fixa de carbono selecionada do grupo que consiste em material celulósico despolimerizado, caldo de cana de açúcar e/ou glicerol ou qualquer combinação dos mesmos, em condições tais que os micro-organismos acumulam pelo menos 10% do seu peso seco na forma de lipídios.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender uma ou mais etapas adicionais de coleta dos micro-organismos, lavagem dos micro-organismos coletados e secagem dos micro-organismos lavados.

3. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa adicional de quebra dos micro-organismos por meios mecânicos.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de quebra forma um homogeneizado microbiano.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa adicional de separar os lipídios da biomassa microbiana.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa adicional de formação de um produto alimentício a partir dos micro-organismos ou lipídios

obtidos deste.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa adicional de modificação química do lipídio por hidrólise do éster, transesterificação, hidrotratamento, hidrocraqueamento, desoxigenação e/ou isomerização.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, **caracterizado** pelo fato de que o micro-organismo é uma microalga selecionada do grupo que consiste nas microalgas listadas na tabela 1.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que a microalga é selecionada do grupo que consiste em *Bracteococcus*, *Chlorella*, *Parachlorella*, *Prototheca*, *Pseudochlorella* e *Scenedesmus*.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a microalga é *Chlorella protothecoides* ou *Prototheca moriformis*.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, **caracterizado** pelo fato de que o micro-organismo é uma levedura oleaginosa.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a levedura oleaginosa é selecionada do grupo que consiste em *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus terricolus*, *Candida sp.*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer*, *Endomycopsis vernalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis* e *Yarrowia lipolytica*.

13. Método de produção de combustível **caracterizado** pelo fato de compreender:

(a) o cultivo de uma população de micro-organismos selecionados do grupo que consiste em microalgas, leveduras

oleaginosas e fungos, na presença de uma fonte fixa de carbono, em que:

(i) os micro-organismos acumulam pelo menos 10% de seu peso seco na forma de lipídios; e

(ii) a fonte fixa de carbono é selecionada do grupo que consiste em glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarose, suco de cana de açúcar, melaço, glicose, arabinose, galactose, xilose, frutose, manose, acetato e qualquer combinação dos mesmos;

(b) o isolamento de componentes de lipídios dos micro-organismos cultivados; e

(c) a submissão de componentes lipídios isolados para uma ou mais reações químicas para gerar ésteres ou alcanos de ácidos graxos,

por meio do qual o combustível é produzido.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que uma ou mais reações químicas são selecionadas do grupo que consiste em transesterificação, hidrotratamento, hidrocraqueamento, desoxigenação e isomerização.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 14, **caracterizado** pelo fato de que a fonte fixa de carbono é um material celulósico despolimerizado, caldo de cana de açúcar, melaço, sacarose e/ou glicerol.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que a fonte fixa de carbono é material celulósico despolimerizado derivado do bagaço da cana de açúcar.

17. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 13, 15 ou 16, **caracterizado** pelo fato de que o combustível é diesel renovável apresentando um número de cetano superior a 65.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13, 14, 15, 16 ou 17, **caracterizado** pelo fato de que o micro-organismo é uma microalga do gênero *Chlorella* ou *Prototheca*.

19. Composição **caracterizada** pelo fato de ser de alcanos ou ésteres de ácidos graxos produzidos a partir do método conforme definido na reivindicação 13.

20. Composição, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada** pelo fato de ser uma composição de hidrocarbonetos líquidos que atenda a norma D1655 para combustível de jato.

21. Composição, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada** pelo fato de ser uma composição de hidrocarbonetos líquidos que atenda a norma D975 para diesel renovável.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada** pelo fato de ser uma composição de ésteres metílicos, que atende a norma ASTM D6751, BS EN 14214 ou norma DIN EN 14214 para o biodiesel.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13, 14, 15 ou 16, **caracterizado** pelo fato de que os componentes lipídicos são submetidos à transesterificação para produzir ésteres de ácidos graxos e glicerina e o glicerol é adicionado a uma segunda cultura microbiana para uso como fonte de carbono.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que os micro-organismos

utilizados para produzir os componentes lipídicos e os micro-organismos da segunda cultura microbiana são da mesma espécie de micro-organismo.

25. Micro-organismo **caracterizado** pelo fato de que é selecionado do grupo que consiste em microalgas, leveduras oleaginosas e fungos que contenham pelo menos 10% do seu peso seco na forma de lipídios e ainda contém um ou mais dos seguintes procedimentos: um gene exógeno de utilização de sacarose, um gene exógeno da lipase, um gene exógeno da enzima da via lipídica e/ou um gene exógeno da enzima de degradação de polissacarídeos e/ou que tenha sido geneticamente modificado para a regulação decrescente da expressão de um gene endógeno da enzima da via lipídica.

26. Micro-organismo, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que contém um gene exógeno de utilização de sacarose, no qual o gene de utilização de sacarose codifica uma enzima sacarose invertase.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24, **caracterizado** pelo fato de que o micro-organismo contém um ou mais genes exógenos selecionado do grupo que é constituído por genes de utilização de sacarose, genes que codificam enzimas da via lipídica, genes da lipase, polissacarídeos e genes de enzimas degradantes e/ou que tenha sido geneticamente modificada para a regulação decrescente da expressão de um gene endógeno da enzima da via lipídica.

28. Micro-organismo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 ou 26, **caracterizado** pelo fato de que o micro-organismo contém (i) um gene exógeno de utilização de

sacarose selecionado do grupo que consiste em um gene frutoquinase, um gene glucoquinase, um gene hexoquinase, um gene sacarose invertase e um gene transportador de sacarose, ou (ii) um gene que codifica uma enzima exógena de via lipídica selecionado do grupo consistindo em um estearoil-ACP desaturase, um glicerolipídeo desaturase, um piruvato desidrogenase, um acetil-CoA carboxilase, uma proteína transportadora de acila, e um glicerol-3 fosfato aciltransferase, uma acil-ACP graxo tioesterase, uma acil-CoA graxo redutase, uma aldeído graxo redutase, uma acil-CoA graxo/aldeído redutase, um aldeído decarbonilase graxo; ou (iii) ambos (i) e (ii).

29. Micro-organismo, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo contém um gene exógeno que codifica uma enzima da via lipídica que é uma tioesterase que catalisa a clivagem de um ácido graxo de 10 a 14 carbonos a partir de uma ACP.

30. Micro-organismo, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que o micro-organismo contém um gene exógeno que codifica uma enzima de via lipídica que é um tioesterase que catalisa a clivagem de um ácido graxo de 12 carbonos a partir de uma ACP.

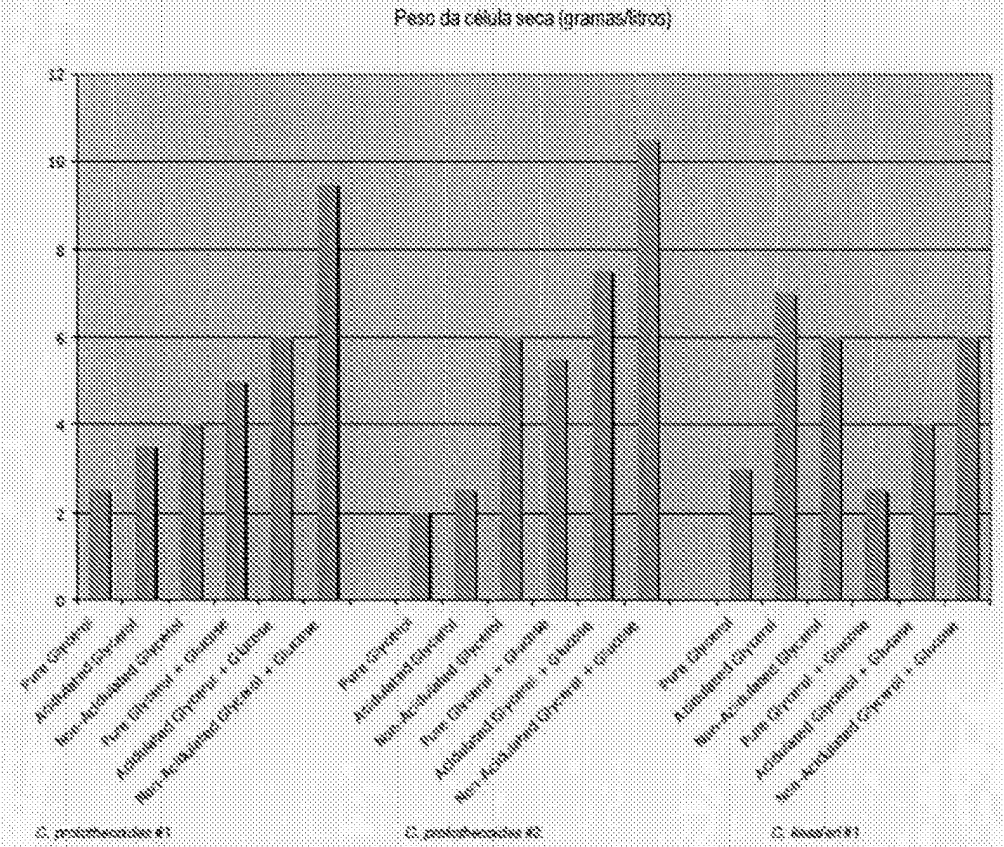


FIGURA 1

Pure Glycerol = Glicerol Puro
Acidulated Glycerol = Glicerol Acidulado
Non-Acidulated Glycerol = Glicerol Não-acidulado
Pure Glycerol + Glucose = Glicerol Puro + Glicose
Acidulated Glycerol + Glucose = Glicerol Acidulado + Glicose
Non-Acidulated Glycerol + Glucose = Glicerol Não-acidulado + Glicose

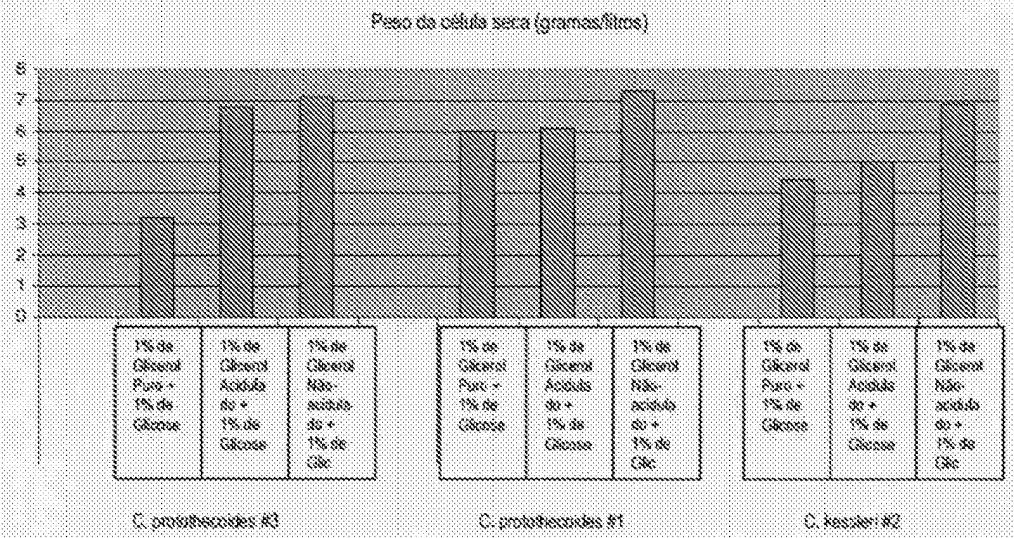

Peso da célula seca (gramas/litros)
1% de Glicerol Puro + 1% de Glicose
1% de Glicerol Acidez de + 1% de Glicose
1% de Glicerol Bio-acidez de + 1% de Glic
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1
C. kessleri #2

FIGURA 2

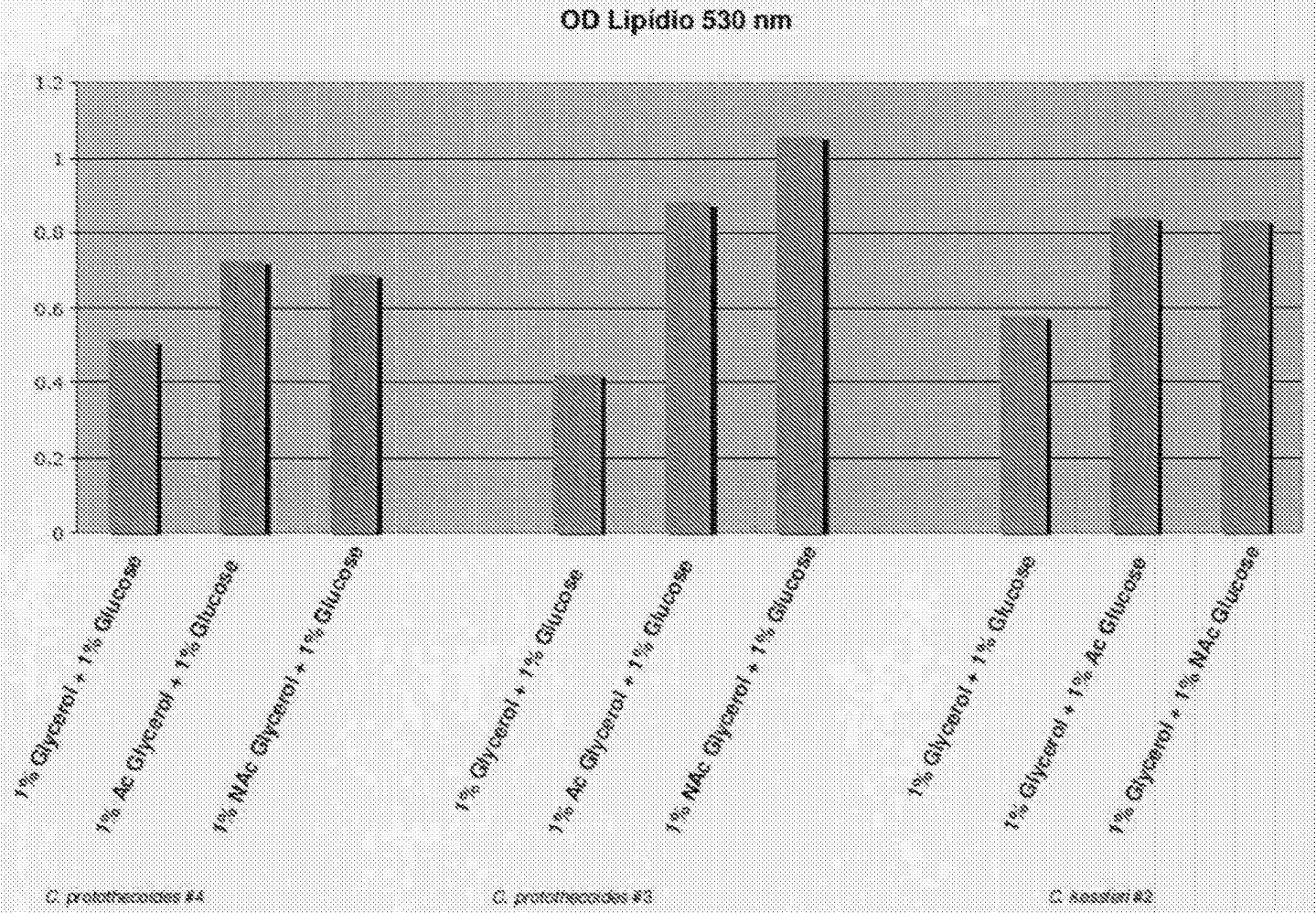

OD Lipídio 530 nm
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose
1% NAc Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Glucose
1% Glycerol + 1% Ac Glucose
1% Glycerol + 1% NAc Glucose
C. protothecoides #4
C. protothecoides #3
C. kessleri #2

FIGURA 3

1% Glycerol + 1% Glucose = 1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% Ac Glycerol + 1% Glucose = 1% de Glicerol Acidulado + 1% de Glicose
1% Nac Glycerol + 1% Glucose = 1% de Glicerol Não-acidulado + 1% de Glicose

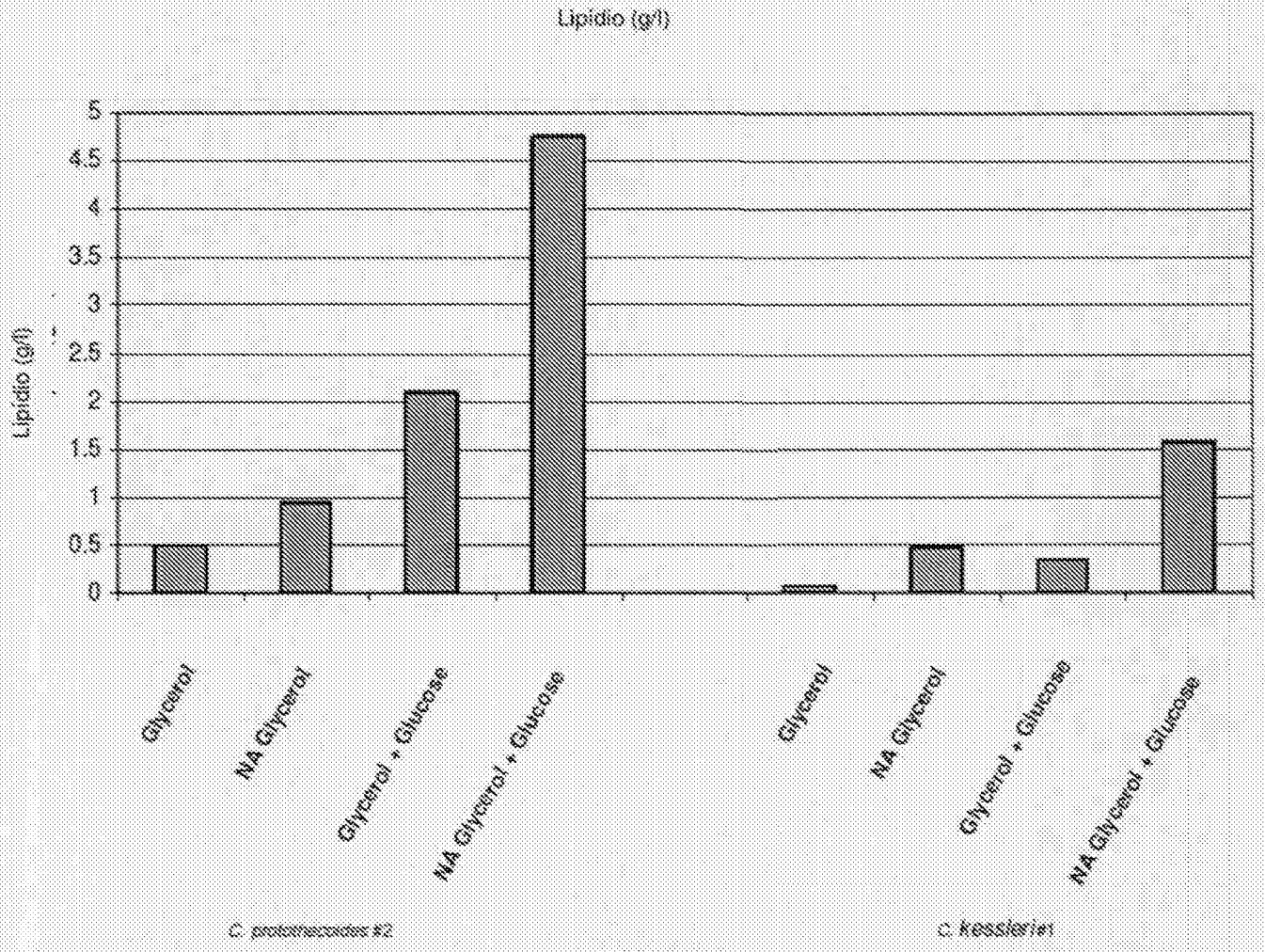

Lipidio (g/l)
Lipidio (g/l)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Glycerol
NA Glycerol
Glycerol + Glucose
NA Glycerol + Glucose
Glycerol
NA Glycerol
Glycerol + Glucose
NA Glycerol + Glucose
C. protothecoides #2
C. kessleri #1

FIGURA 4

Glycerol = Glicerol
NA Glycerol = Glicerol Não-acidulado
Glycerol + Glucose = Glicerol + Glicose
NA Glycerol + Glucose = Glicerol Não-acidulado + Glicose

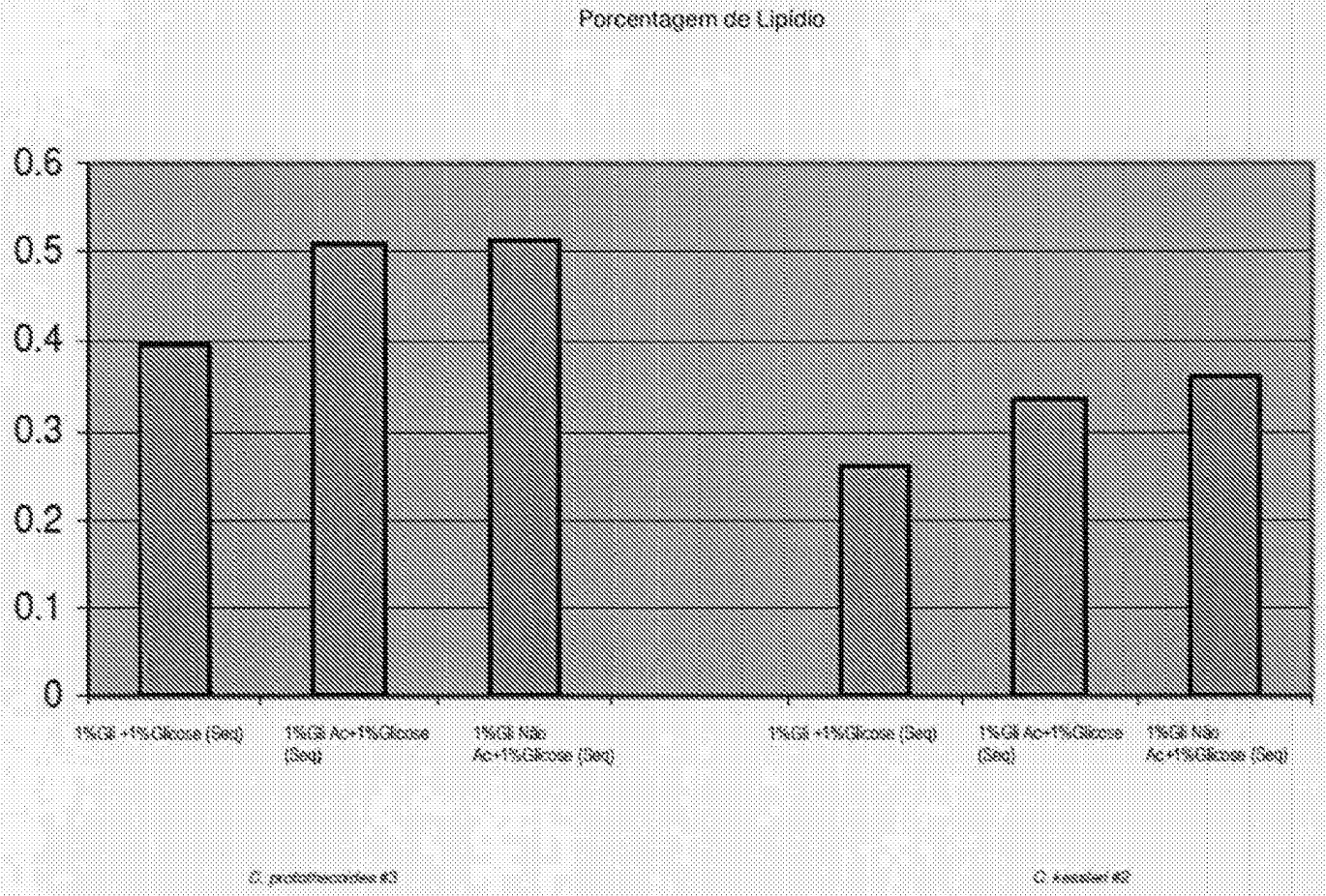
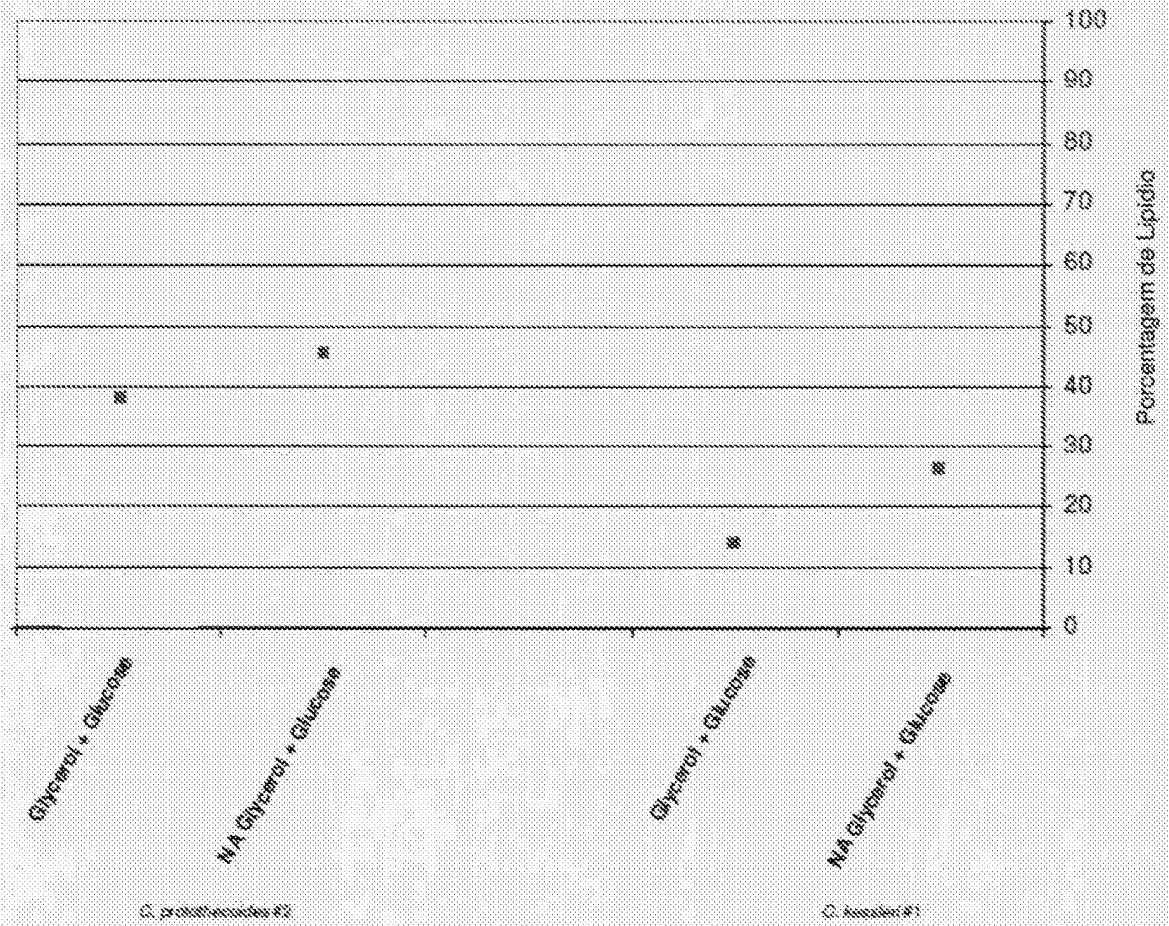

Porcentagem de Lipídio
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1%Gli +1%Glicose (Seq)
1%Gli Ac+1%Glicose (Seq)
1%Gli Não Ac+1%Glicose (Seq)
1%Gli +1%Glicose (Seq
1%Gli Ac+1%Glicose (Seq)
1%Gli Não Ac+1%Glicose (Seq)

FIGURA 5



Glycerol + Glucose = Glicerol + Glicose
NA Glycerol + Glucose = Glicerol Não-acidulado + Glicose

FIGURA 6

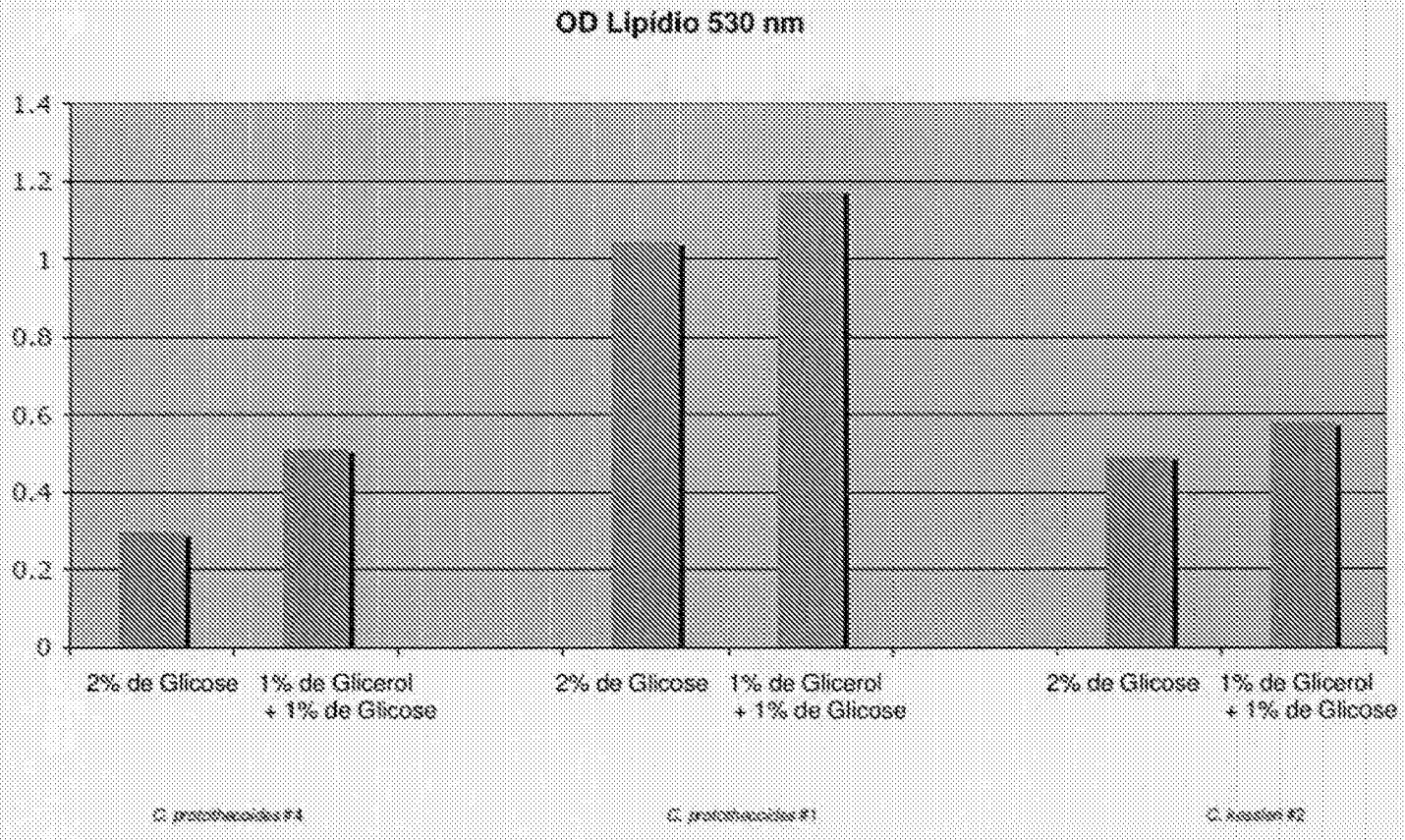

OD Lipídio 530 nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose
2% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose
2% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose

FIGURA 7

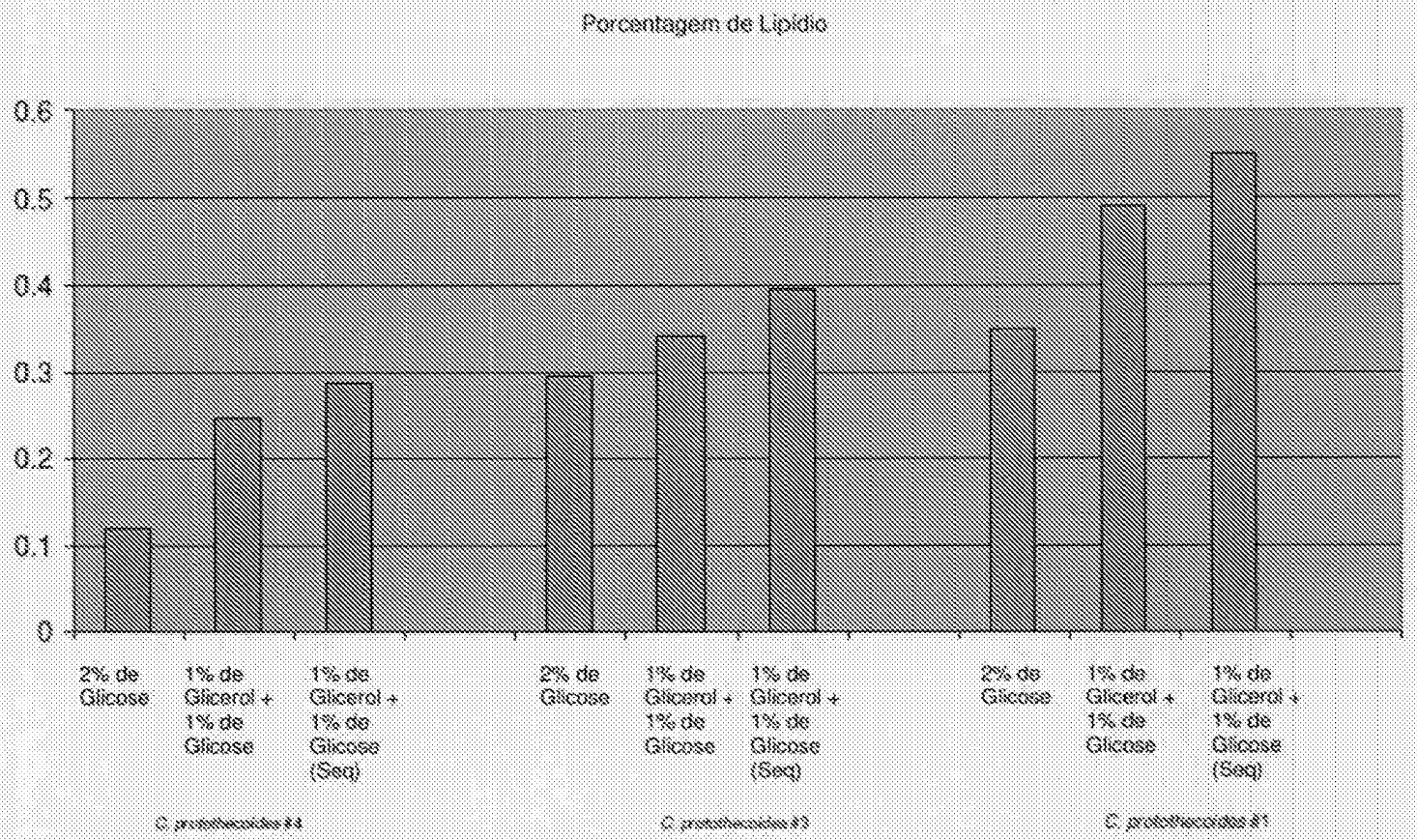

Porcentagem de Lipídio
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)
2% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)
2% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)

FIGURA 8

Figura 9

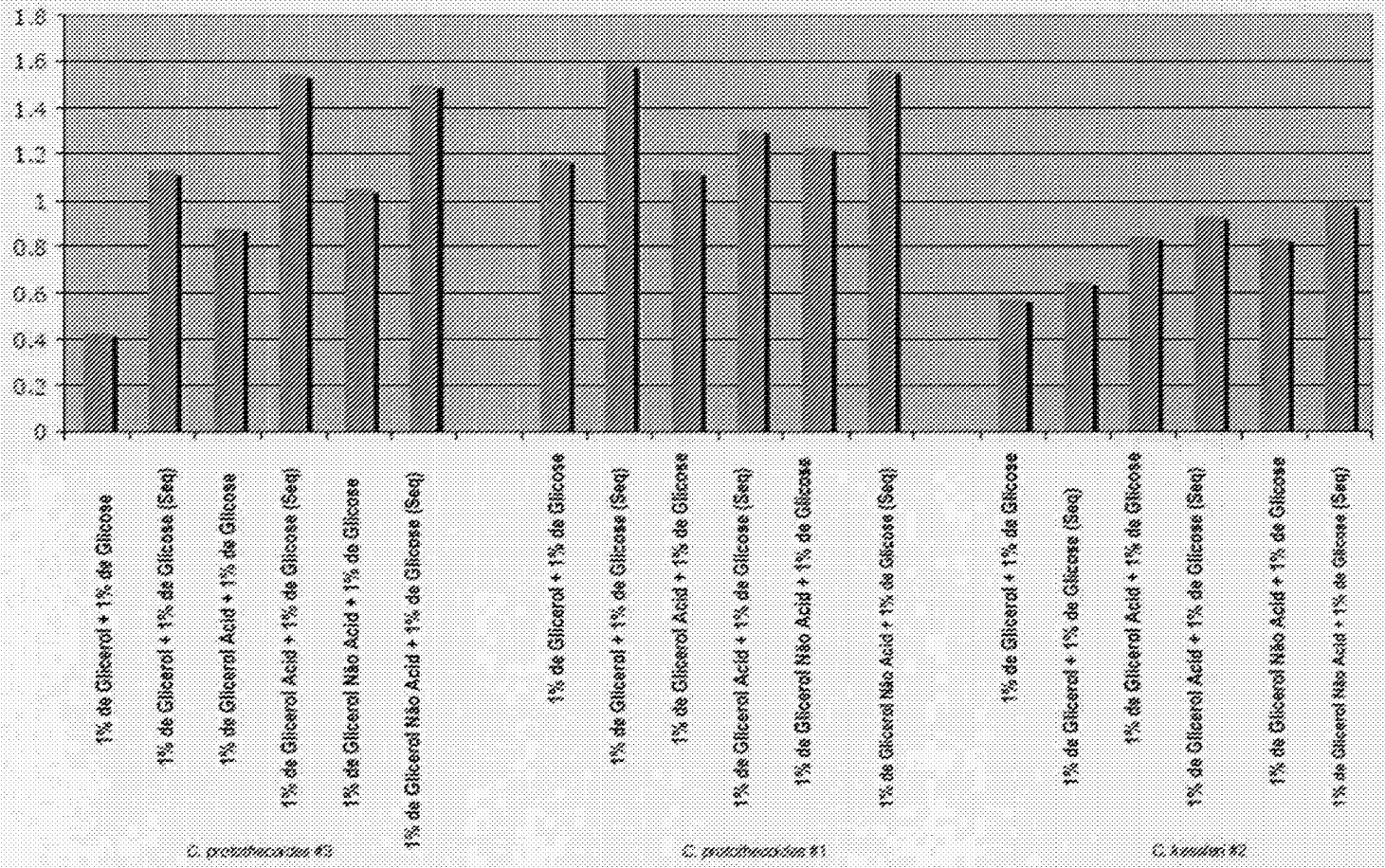
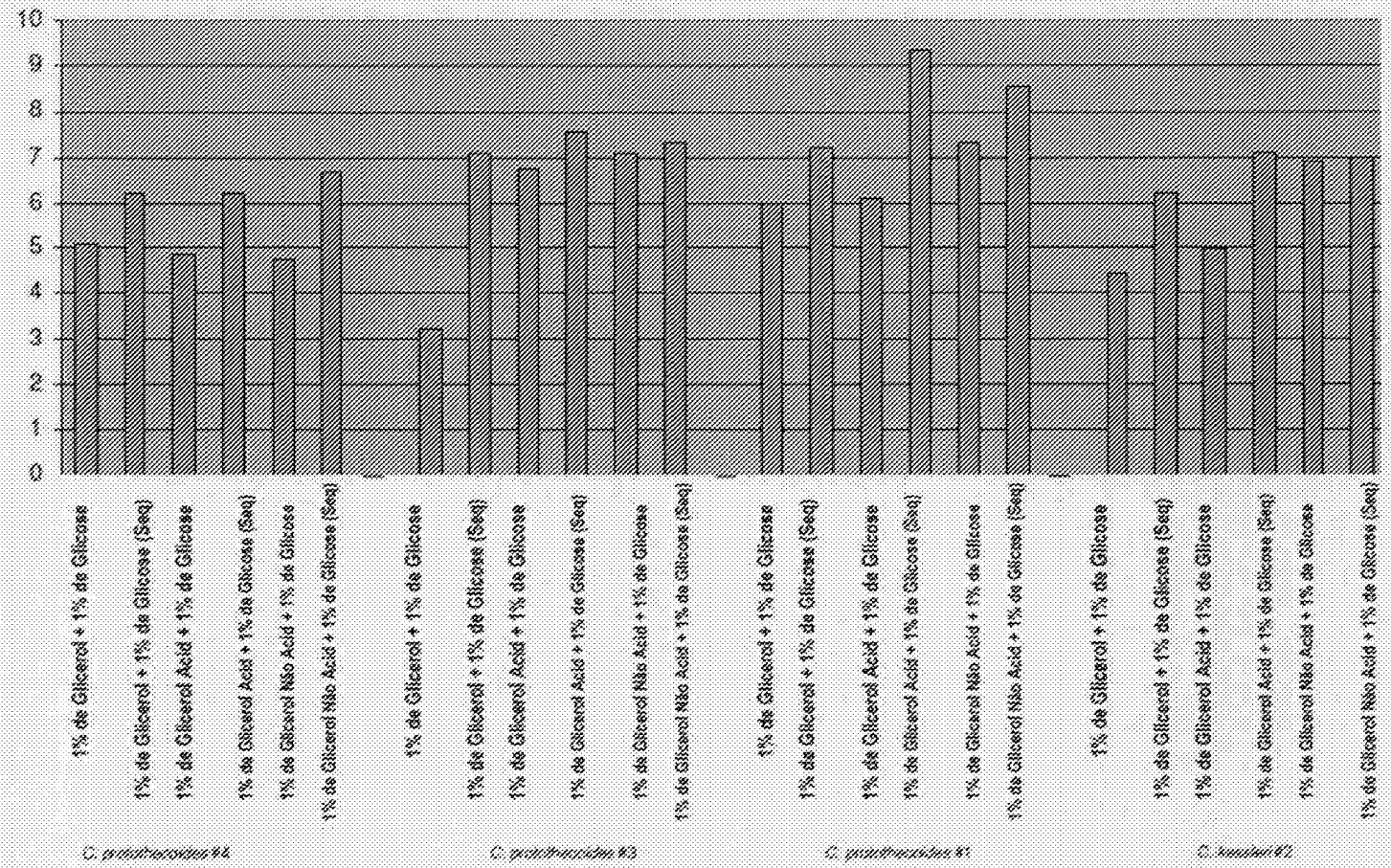
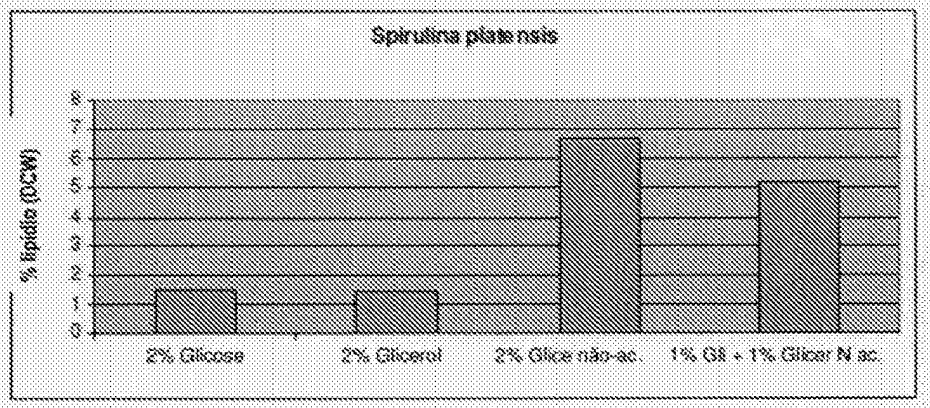

OD Lipídio 530 nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose (Seq)
C. protothecoides #3
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose (Seq)
C. protothecoides #1
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose (Seq)
C. kruegii #2

Figura 10


Peso da Célula Seca (gramas/litros)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol + 1% de Glicose
1% de Glicerol + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Acid + 1% de Glicose (Seq)
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose
1% de Glicerol Não Acid + 1% de Glicose (Seq)
C. pinotrecolas #4
C. pinotrecolas #3
C. pinotrecolas #1
C. lusitaniae #2

(a)


Spirulina platensis
% lipídio (DCW)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
2% Glicose
2% Glicerol
2% Glice não-ac.
1% Gl + 1% Glicer N ac.

(b)

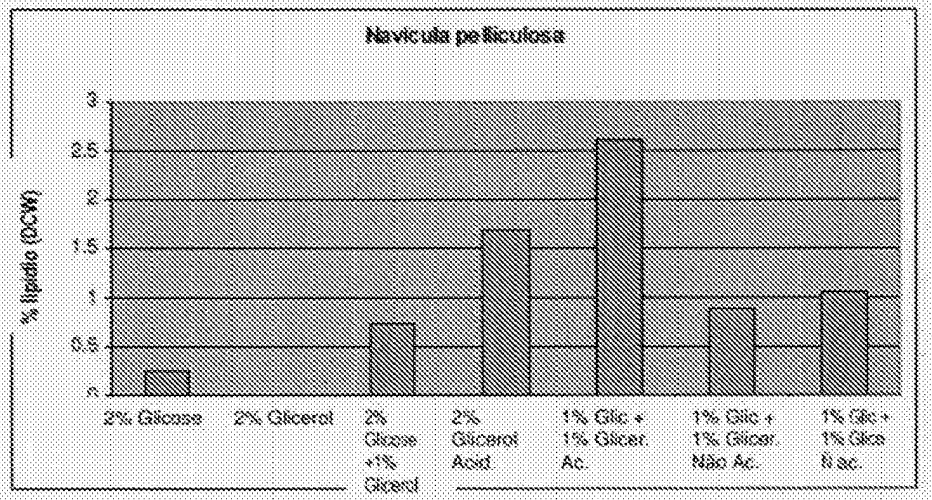
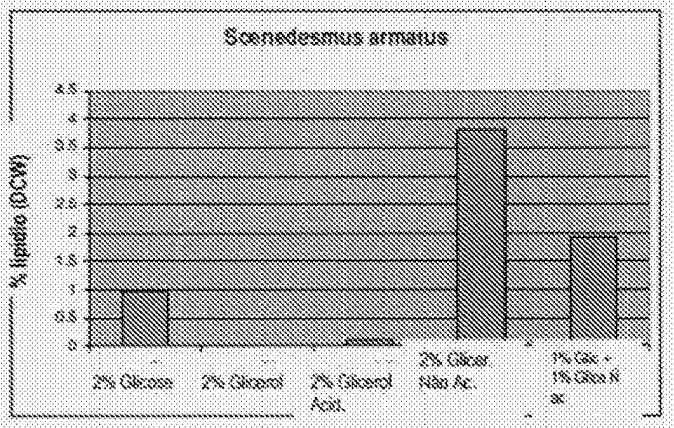

Navicula pelliculosa
% lipídio (DCW)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
2% Glicose
2% Glicerol
2% Glicose +1% Glicerol
2% Glicerol Acid
1% Glic + 1% Glicer. Ac.
1% Glic + 1% Glicer. Não Ac.
1% Glic + 1% Glico N ac.

FIGURA 11

(a)


Scenedesmus armatus
% lipídio (DCW)
2% Glicose
2% Glicerol
2% Glicerol Acet.
2% Glicer. Não Ac.
1% Glic + 1% Glicer Ñ ac.

(b)

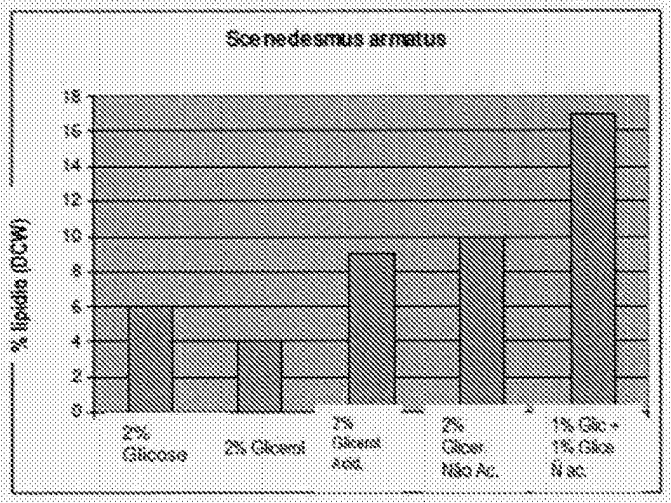

Scenedesmus armatus
% lipídio (DCW)
2% Glicose
2% Glicerol
2% Glicerol Acet.
2% Glicer. Não Ac.
1% Glic + 1% Glicer Ñ ac.

FIGURA 12

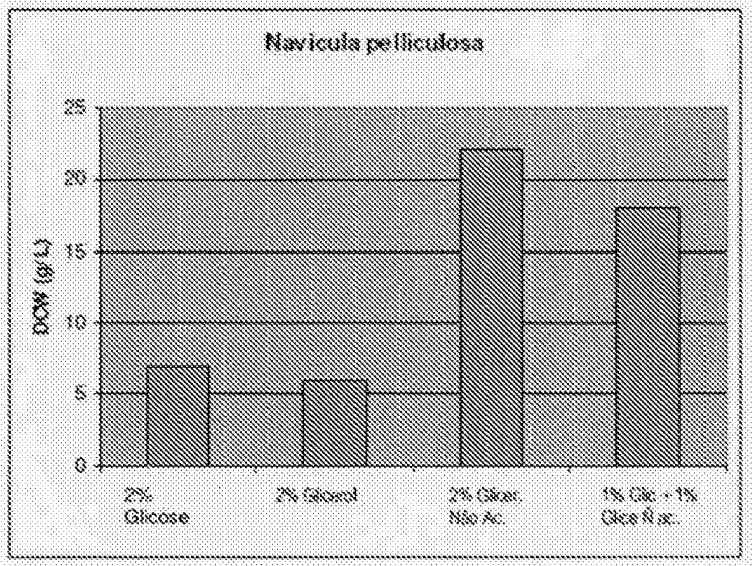
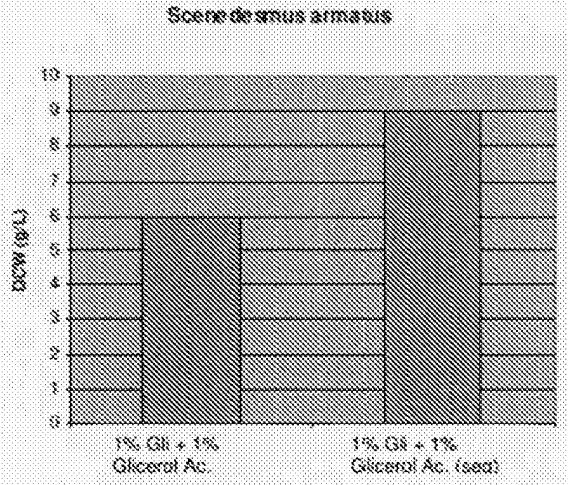

Navicula pelliculosa
DCW (g/L)
25
20
15
10
5
0
2% Glicose
2% Glicerol
2% Glicer. Não Ac.
1% Glic. + 1% Glce Ñ ac.

FIGURA 13

(a)


Scenedesmus armatus
DCW (g/L)
1% Gli + 1% Glicerol Ac.
1% Gli + 1% Glicerol Ac. (sec)

(b)

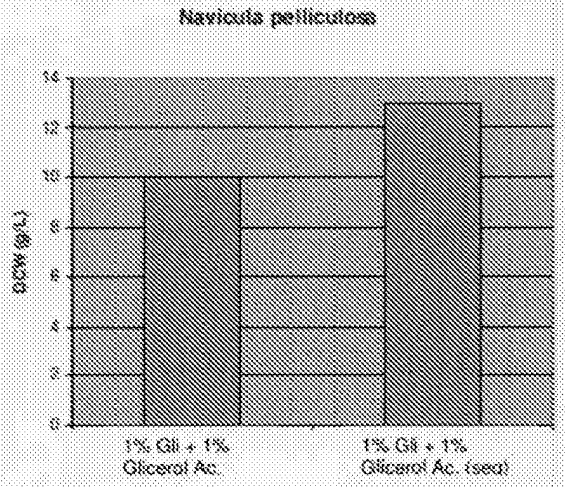

Navicula pelliculosa
DCW (g/L)
1% Gli + 1% Glicerol Ac.
1% Gli + 1% Glicerol Ac. (sec)

FIGURA 14

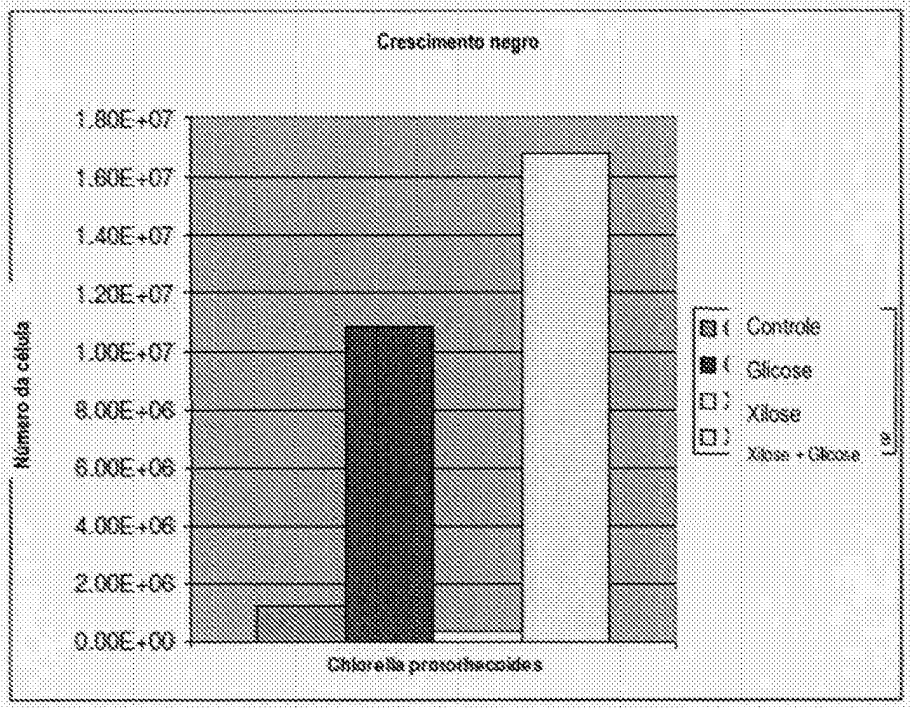
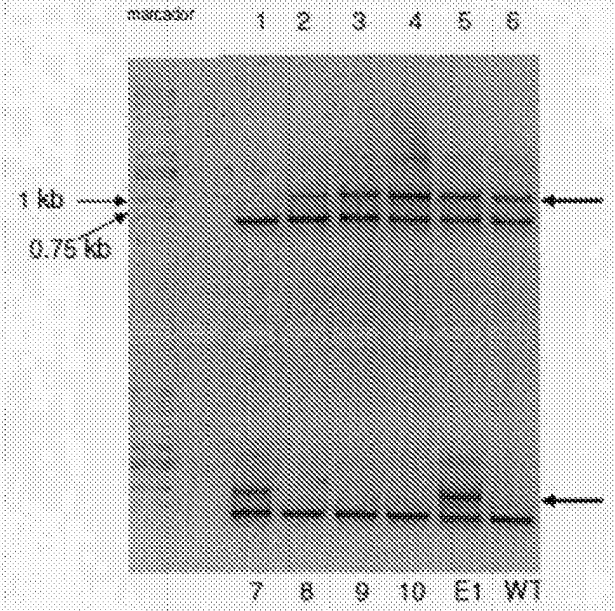

Crescimento negro
1.80E+07
1.60E+07
1.40E+07
1.20E+07
1.00E+07
8.00E+06
6.00E+06
4.00E+06
2.00E+06
0.00E+00
Número da célula
Controle
Glicose
Xilose
Xilose + Glicose
Chlorella protothecoides

FIGURA 15



Pistas 1-10: transformantes biolísticos
Pista E1: transformante eletroporação
Pista: DNA genômico

FIGURA 16

Tz **Códons mais preferidos de Dunaliella salina**

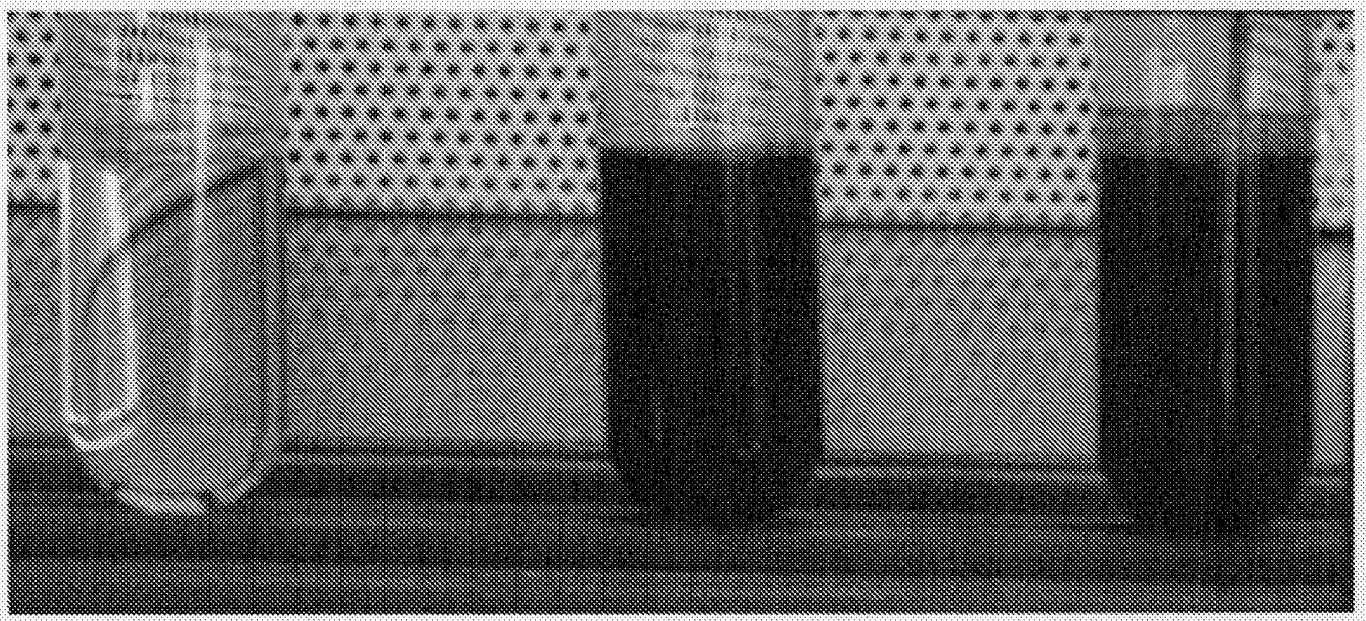
Phe	UUU	39 (0.82)	Ser	UCU	50 (1.04)
	UUC	56 (1.18)		UCC	60 (1.25)
Leu	UUA	18 (0.20)		UCA	46 (0.96)
	UUG	46 (0.51)		UCG	43 (0.89)
Tyr	UAU	18 (0.38)	Cys	UGU	46 (0.77)
	UAC	36 (1.41)		UGC	73 (1.23)
ter	UAA	0 (0.00)	ter	UGA	43 (0.00)
ter	UAG	15 (0.60)	Trp	UGG	69 (1.00)
Leu	CUU	89 (0.97)	Pro	CCU	80 (0.96)
	CUC	73 (1.45)		CCC	88 (1.06)
	CUA	23 (0.44)		CCA	93 (1.14)
	CUG	103 (2.04)		CCG	65 (0.80)
His	CAU	58 (0.80)	Arg	CGU	39 (0.76)
	CAC	63 (1.12)		CGC	63 (1.23)
Gln	CAA	53 (0.84)		CGA	46 (0.90)
	CAG	82 (1.16)		CGG	47 (0.92)
Ile	AUU	28 (0.69)	Thr	ACU	32 (0.67)
	AUC	61 (1.76)		ACC	78 (1.60)
	AUA	19 (0.55)		ACA	41 (0.86)
Met	AUG	42 (1.00)		ACG	41 (0.86)
Asn	AAU	26 (0.75)	Ser	AGU	23 (0.48)
	AAC	43 (1.25)		AGC	67 (1.39)
Lys	AAA	32 (0.54)	Arg	AGA	33 (1.00)
	AAG	86 (1.46)		AGG	61 (1.18)
Val	GUU	36 (0.75)	Ala	GCU	57 (0.79)
	GUC	54 (1.13)		GCC	97 (1.34)
	GUA	30 (0.63)		GCA	89 (1.23)
	GUG	71 (1.49)		GCG	47 (0.65)
Asp	GAU	40 (0.95)	Gly	GGU	35 (0.60)
	GAC	46 (1.05)		GGC	78 (1.33)
Glu	GAA	41 (0.68)		GGA	54 (0.92)
	GAG	80 (1.32)		GGG	67 (1.15)

ıides **Códons mais preferidos de Chlorella pyrenoidosa**

FIGURA 17

A. Dunaliella salina most preferred codons	B. Chlorella pyrenoidosa most preferred codon
TTC (Phe)	TTC (Phe)
TAC (Tyr)	TAC (Tyr)
TGC (Cys)	TGC (Cys)
TAA (Stop)	TGA (Stop)
TGG (Trp)	TGG (Trp)
CCC (Pro)	CCC (Pro)
CAC (His)	CAC (His)
CGC (Arg)	CGC (Arg)
CTG (Leu)	CTG (Leu)
CAG (Gln)	CAG (Gln)
ATC (Ile)	ATC (Ile)
ACC (Thr)	ACC (Thr)
AAC (Asn)	GAC (Asp)
AGC (Ser)	TCC (Ser)
ATG (Met)	ATG (Met)
AAG (Lys)	AAG (Lys)
GCC (Ala)	GCC (Ala)
GAC (Asp)	AAC (Asn)
GGC (Gly)	GGC (Gly)
GTG (Val)	GTG (Val)
GAG (Glu)	GAG (Glu)

FIGURA 18



(a) (b) (c)

FIGURA 19

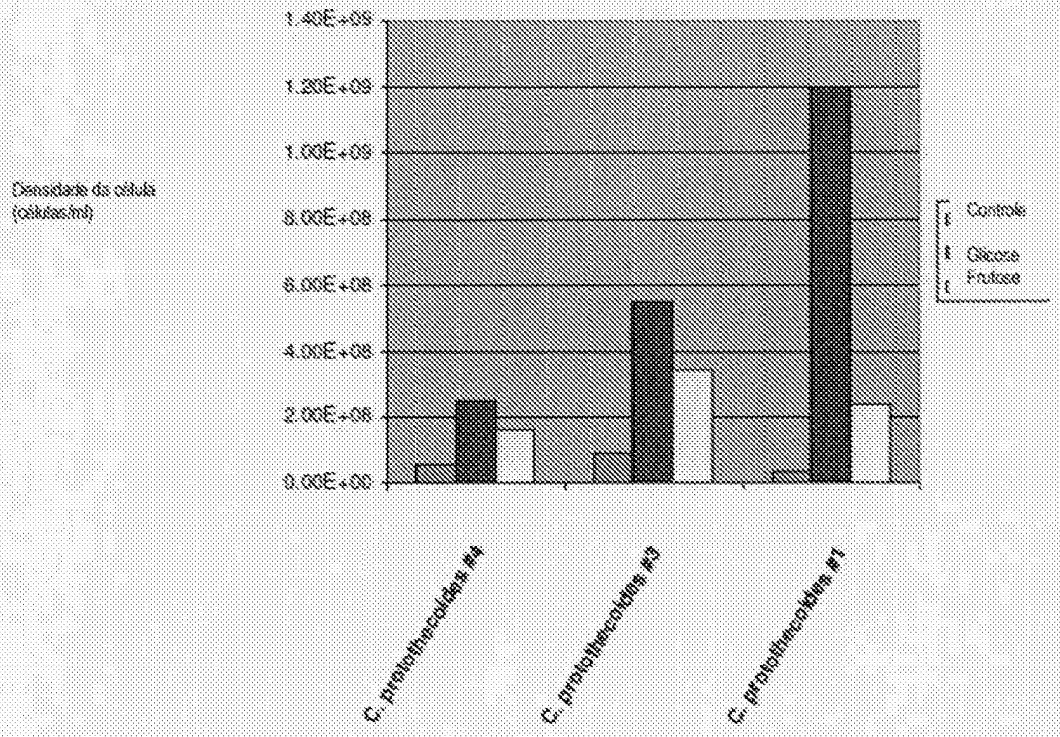

Densidade da célula (células/ml)
1.40E+09
1.20E+09
1.00E+09
8.00E+08
6.00E+08
4.00E+08
2.00E+08
0.00E+00
Controle
Glicose
Frutose
C. prototheacoides #4
C. protothecoides #3
C. protothecoides #1

FIGURA 20

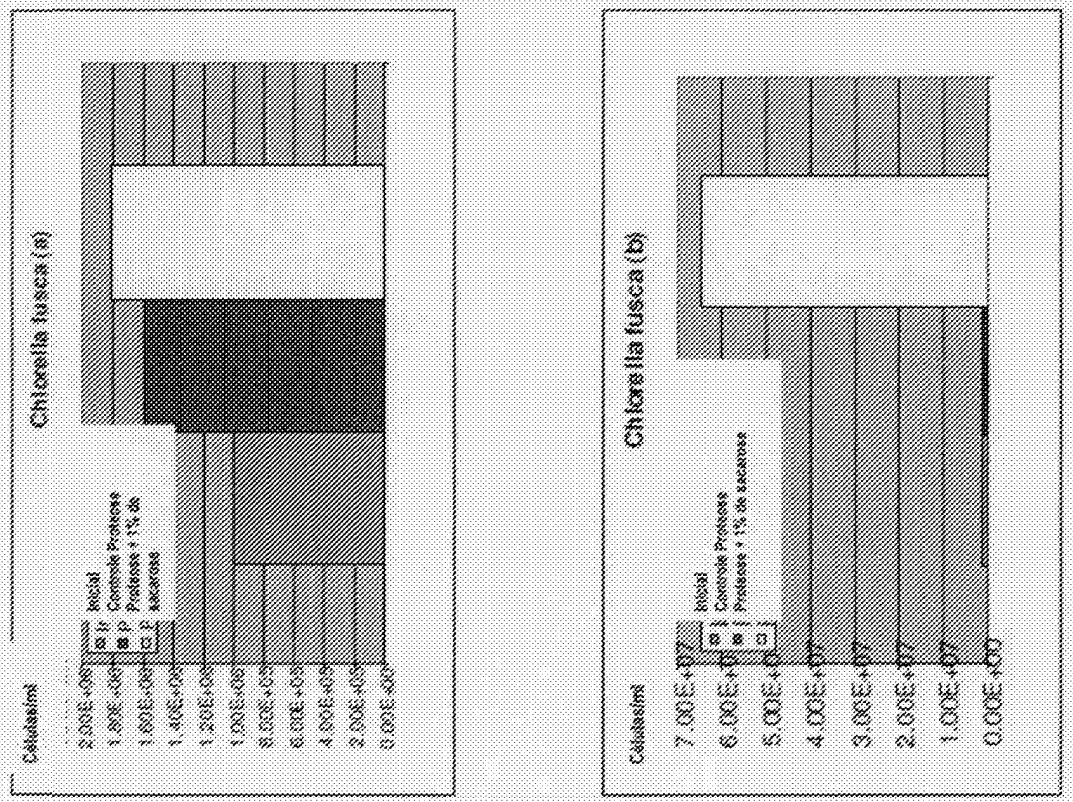

Chlorella fusca (a)
Células/ml
Inicial
Controle Proteose
Proteose + 1% de
Chlorella fusca (b)
Células/ml
Inicial
Controle Proteose
Proteose + 1% de

FIGURA 21

Células/ml
Chlorella kessleri (a)
Inicial
Controle Protease
Protease + 1% de sacarose
30000000
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0

Células/ml
Chlorella kessleri (b)
Inicial
Controle Protease
Protease + 1% de sacarose
8.00E+08
7.00E+08
6.00E+08
5.00E+08
4.00E+08
3.00E+08
2.00E+08
1.00E+08
0.00E+00

FIGURA 22.

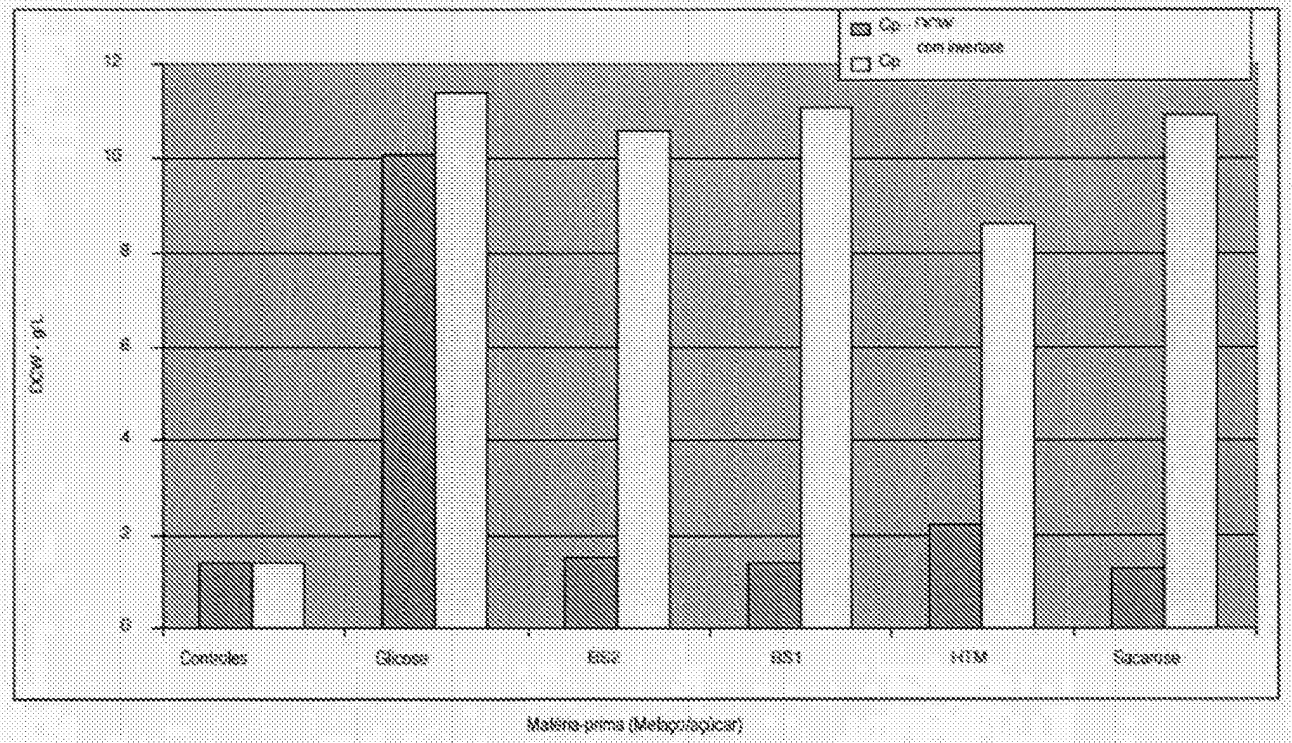


FIGURA 23

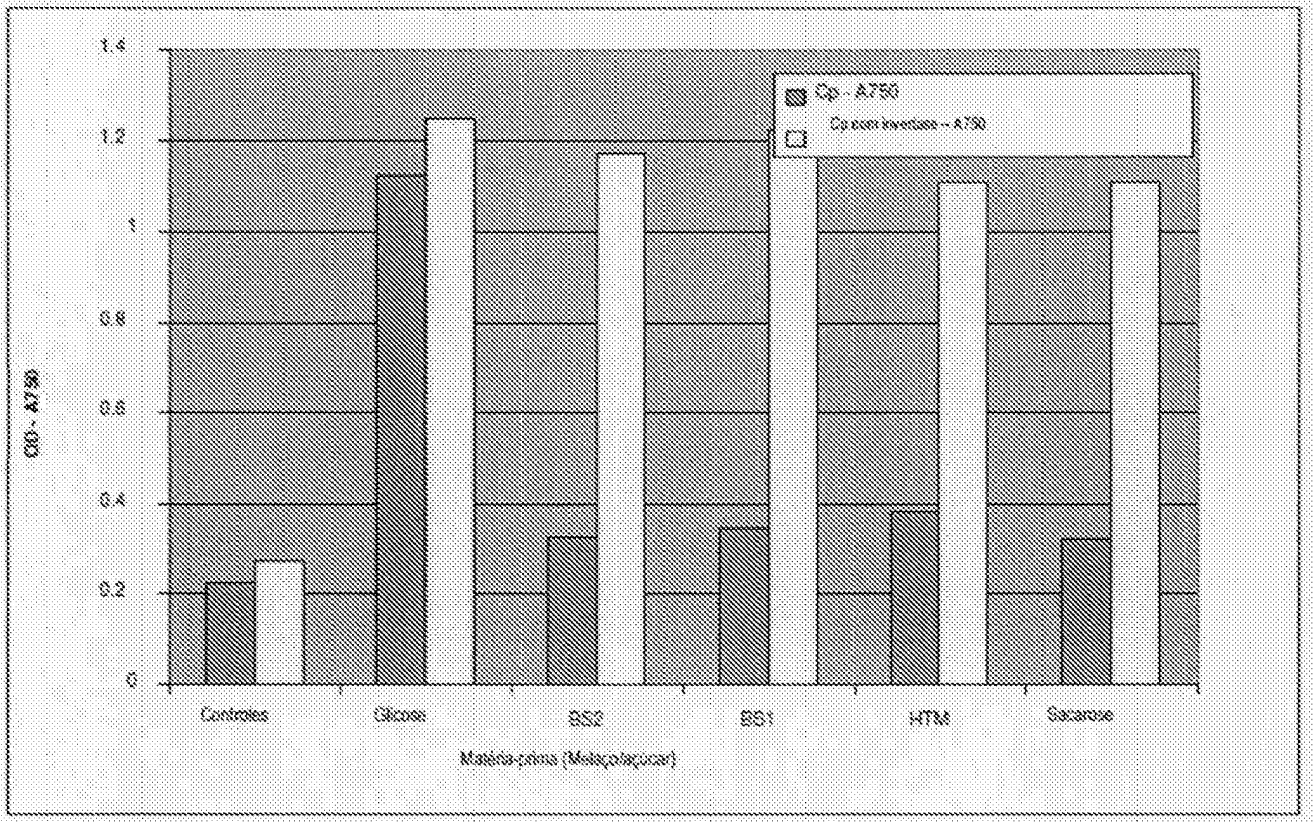

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Cp - A750
Cp com levedura - A750
Controles
Glicose
BS2
BS1
HTM
Sacarose
Matéria-prima (Melaço/açúcar)

FIGURA 24

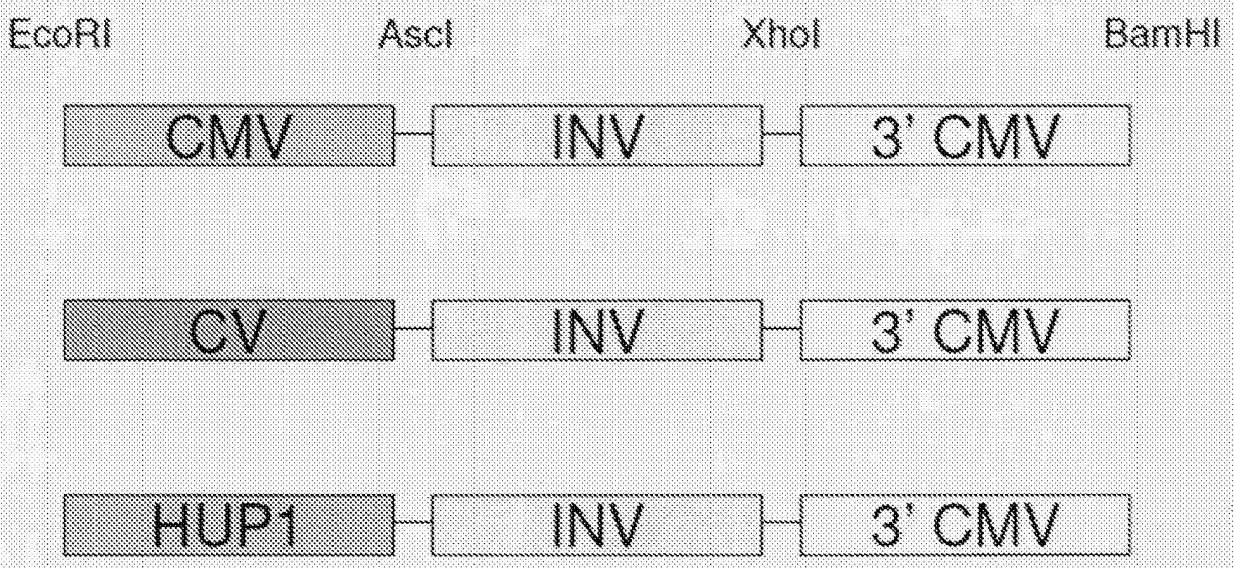


FIGURA 25

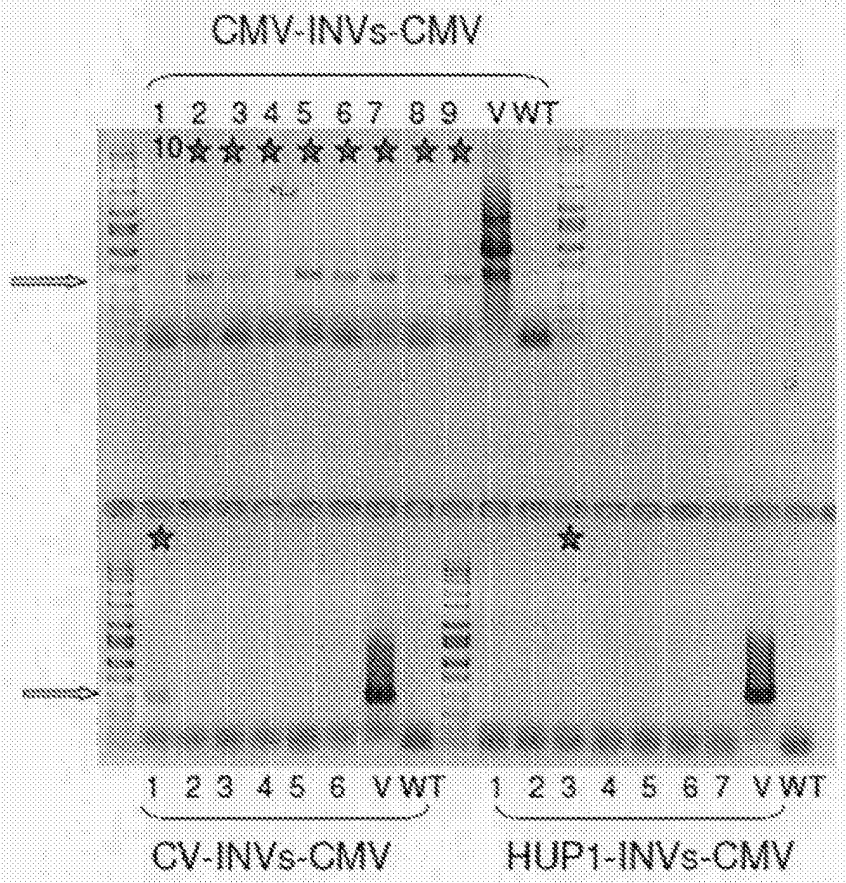
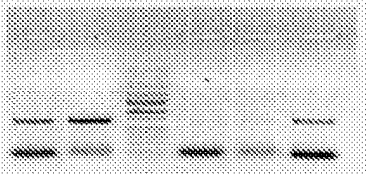

CMV-INVs-CMV
1 2 3 4 5 6 7 8 9 V WT
10
1 2 3 4 5 6 V WT
1 2 3 4 5 6 7 V WT
CV-INVs-CMV
HUP1-INVs-CMV

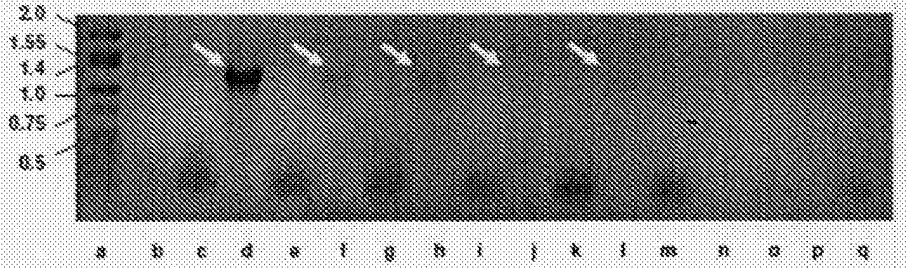
FIGURA 26

Figura 27



a – Plasmídeo (200 pg/uL)
b – Plasmídeo (200 ng/uL)
c – DNA tipo selvagem
d – Transformante nº 1
e – Transformante nº 2

Figura 28



a – Padrões de tamanho de DNA em pares de base de quilo
b – Controledo conjunto de primer 2 (sem modelo)
c – Controle do conjunto de primer 4 (sem modelo)
d – 1 picograma de controle de plasmídeo, conjunto de primer 2
e - 1 picograma de controle de plasmídeo, conjunto de primer 4
f – Transformante de Chlorella minutíssima nº 1, conjunto de primer 2
g - Transformante de Chlorella minutíssima nº 1, conjunto de primer 4
h - Transformante de Chlorella minutíssima nº 2, conjunto de primer 2
i - Transformante de Chlorella minutíssima nº 2, conjunto de primer 4
j - Transformante de Chlorella emersonii nº 1, conjunto de primer 2
k - Transformante de Chlorella emersonii nº 1, conjunto de primer 4
l - Transformante de Chlorella emersonii nº 2, conjunto de primer 2
m - Transformante de Chlorella emersonii nº 2, conjunto de primer 4
n - Chlorella minutíssima tipo selvagem, conjunto de primer 2
o - Chlorella minutíssima tipo selvagem, conjunto de primer 4
p - Chlorella emersonii tipo selvagem, conjunto de primer 2
q - Chlorella minutíssima tipo selvagem, conjunto de primer 4

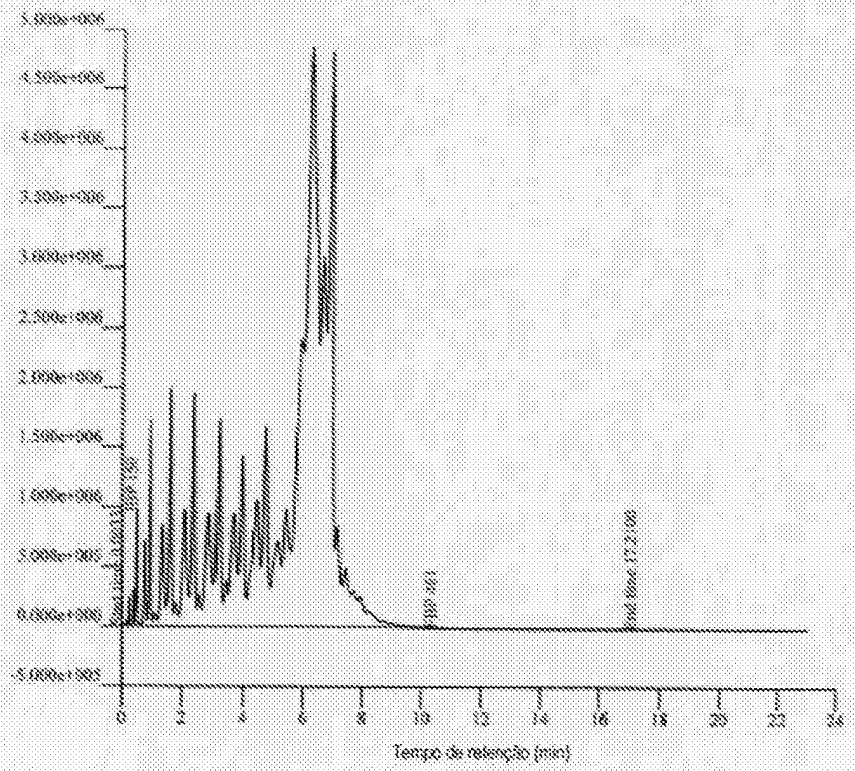


FIGURA 29

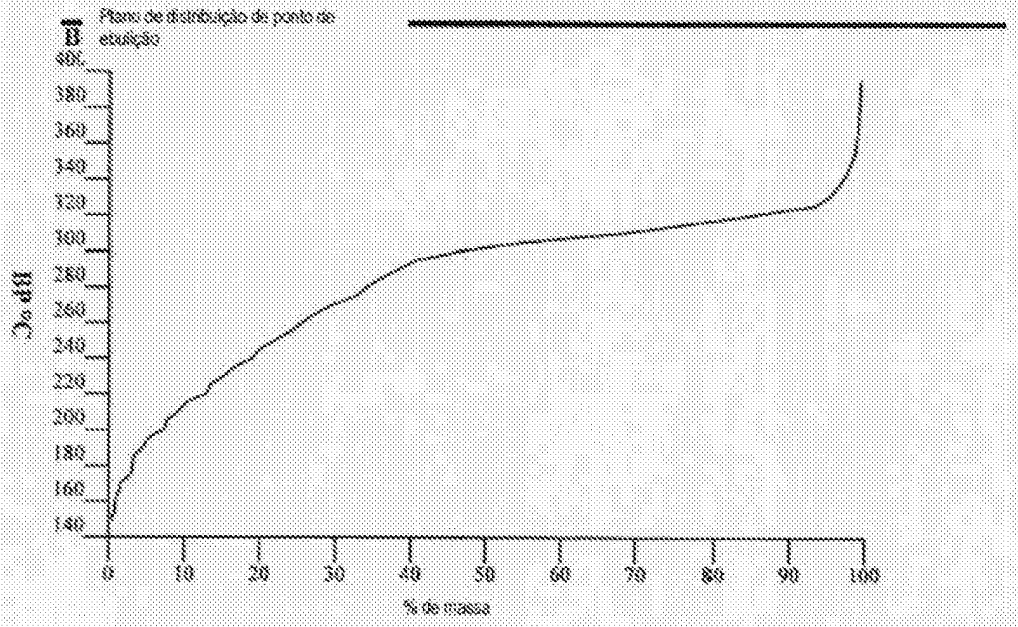

Plano de distribuição de ponto de ebulição
°C
400
380
360
340
320
300
280
260
240
220
200
180
160
140
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
% de massa

FIGURA 30

PRODUÇÃO DE ÓLEO EM MICROORGANISMOS

A invenção fornece método e composição útil para a produção de óleo, combustíveis, óleos químicos e outros compostos em microorganismos. Em particular, a invenção fornece microorganismos oleaginosos e método de cultivo de baixo custo destes microorganismos. A invenção também fornece células microbianas contendo genes exógenos de codificação, por exemplo, uma lipase, transportador de sacarose, invertase sacarose, frutoquinase, um polissacarídeo-enzima degradante, acil-graxo tioesterase ACP redutase acil-CoA/aldeído graxo, acil-CoA graxo redutase, aldeído redutase graxo, decarbonilase aldeído graxo e/ou uma proteína transportadora de acil. A invenção também inclui o método de fabricação de combustíveis de transporte, tais como diesel renovável, biodiesel e combustível de aviação renováveis.