



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

**(11) PI 0921543-3 B1**



**(22) Data do Depósito:** 30/11/2009

**(45) Data de Concessão:** 24/11/2020

**(54) Título:** MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE ÓLEO, E PARA FABRICAR UM PRODUTO QUÍMICO, E, COMPOSIÇÃO DE ÓLEO.

**(51) Int.Cl.:** C10L 1/19; A23K 1/16; C07C 9/00; C12N 1/12.

**(30) Prioridade Unionista:** 01/12/2008 US 61/118994; 23/06/2009 US 61/219525; 28/11/2008 US 61/118590; 30/04/2009 US 61/174357.

**(73) Titular(es):** TERRAVIA HOLDINGS, INC..

**(72) Inventor(es):** SCOTT FRANKLIN; ARAVIND SOMANCHI; KAREN ESPINA; GEORGE RUDENKO; PENELOPE CHUA.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2009066141 de 30/11/2009

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/063031 de 03/06/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 27/05/2011

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE ÓLEO DE TRIGLICERÍDEOS, COMPOSIÇÃO DE ÓLEO DE TRIGLICERÍDEO, ÓLEO MISTURADO, MÉTODO PARA FABRICAR UM COMPOSTO QUÍMICO, E, ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE. Métodos e composições para a produção de óleo, combustíveis, oleoquímicos e outros compostos em Prototheca são fornecidos, incluindo microrganismos contendo óleo e métodos de cultivo de baixo custo desses microrganismos. Células de Prototheca contendo genes exógenos codificando, por exemplo, uma lipase, um transportador de sacarose, uma invertase sacarose, uma frutoquinase, uma enzima de degradação de polissacarídeo, uma acil-ACP tioesterase graxa, uma redutase acil-CoA graxa/aldeído, uma redutase acil-CoA graxa, uma redutase de aldeído graxo, uma decarbonilase de aldeído graxo e/ou uma proteína transportadora de acila são úteis na fabricação de combustíveis de transporte, tal como diesel renovável, biodiesel e combustível de jato renovável.

**“MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE ÓLEO, E PARA FABRICAR UM PRODUTO QUÍMICO, E, COMPOSIÇÃO DE ÓLEO”**

**REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS RELACIONADOS**

[001] O presente pedido reivindica o benefício de acordo com 35 U.S.C. 119(e) do pedido de patente provisional US número 61/118.590, depositado em 28 de novembro de 2008, pedido de patente provisional US número 61/118.994, depositado em 1 de dezembro de 2008, pedido de patente provisional US número 61/174.357, depositado em 30 de abril de 2009, e pedido de patente provisional US número 61/219.525, depositado em 23 de junho de 2009, Cada desses pedidos é incorporado aqui a título de referência na íntegra para todas as finalidades.

**REFERENCIA A UMA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

[002] Este pedido inclui uma listagem de sequência como mostrado nas páginas 1 a 72, apenas ao presente.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[003] A presente invenção refere-se à produção de óleos, combustíveis e oleoquímicos feitos de microorganismos. Em particular, a revelação refere-se a microalgas contendo óleo, métodos de cultivar as mesmas para a produção de compostos úteis, incluindo lipídeos, ésteres de ácido graxo, ácidos graxos, aldeídos, alcoóis, e alcanos, e métodos e reagentes para geneticamente alterar os mesmos para melhorar a eficiência de produção e alterar o tipo e composição dos óleos produzidos pelos mesmos.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[004] Combustível fóssil é um termo geral para depósitos geológicos combustíveis enterrados de materiais orgânicos, formados de plantas e animais em decomposição que foram convertidos em óleo bruto, carvão, gás natural, ou óleos pesados por exposição a calor e pressão na crosta da terra durante centenas de milhões de anos. Combustíveis fósseis é um recurso não renovável, finito.



[005] A crescente demanda por energia pela economia global também colocou pressão crescente sobre o custo de hidrocarbonetos. Além da energia, muitas indústrias, incluindo fabricantes químicos e de plástico, dependem intensamente na disponibilidade de hidrocarbonetos como um insumo para seus processos de fabricação. Alternativas eficazes em termos de custo para fontes atuais de fornecimento poderiam ajudar a diminuir a pressão ascendente sobre energia e esses custos de matéria-prima.

[006] A publicação PCT número 2008/151149 descreve métodos e materiais para cultivar microalgas para a produção de óleo e particularmente exemplifica a produção de combustível diesel de óleo produzido pelas microalgas *Chlorella protothecoides*. Permanece necessidade de métodos aperfeiçoados para produzir óleo em microalgas, particularmente para métodos que produzem óleos com comprimento de cadeia mais curto e grau mais elevado de saturação e sem pigmentos, com maior rendimento e eficiência. A presente invenção atende essa necessidade.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] A invenção provê células do gênero *Prototheca* compreendendo um gene exógeno, e em algumas modalidades, a célula é uma cepa da espécie *Prototheca moriformis*, *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora* ou *Prototheca zopfii* e em outra modalidade a célula tem uma sequência rRNA 23S com pelo menos 70, 75, 80, 85 ou 95% de identidade de nucleotídeo para uma ou mais das SEQ ID NOS: 11-19, Em algumas células o gene exógeno é sequência de codificação e está em ligação operável com um promotor, e em algumas modalidades o promotor é de um gene endógeno a uma espécie do gênero *Prototheca*. Em modalidades adicionais a sequência de codificação codifica uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma invertase de sacarose, um tioesterase ACP-acila graxa, uma reductasae de aldeído/CoA-acila graxa, uma reductase de CoA-acila graxa, uma reductase de aldeído graxo, uma decarbonilase de aldeído graxo, uma proteína

portadora de acila e uma proteína que transmite resistência a um antibiótico. Algumas modalidades de uma tioesterase ACP-acila graxa que tem atividade de hidrólise no sentido de um ou mais substratos ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C8, C10, C12 ou C14, incluindo tioesterases ACP-acila com pelo menos 50, 60, 70, 80 ou 90% de identidade de aminoácidos com uma ou mais sequências selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 59, 61, 63 e 138-140, Em modalidades adicionais a sequência de codificação compreende uma sequência de direcionamento para plastídio de microalgas, e em algumas modalidades as microalgas são uma espécie do gênero *Prototheca* ou *Chlorella* bem como outros gêneros da família *Chlorellaceae*. Em algumas modalidades a sequência de direcionamento para plastídio tem pelo menos 20, 25, 35, 45 ou 55% de identidade de sequência de aminoácidos para uma ou mais das SEQ ID NOS: 127-133 e é capaz de direcionar uma proteína codificada por um gene exógeno não localizado no genoma de plastídio para o plastídio. Em outras modalidades o promotor é regulado ascendentemente em resposta à redução ou eliminação de nitrogênio no meio de cultura da célula, como pelo menos uma regulação ascendente de 3 vezes como determinado por abundância de transcrito em uma célula do gênero *Prototheca* quando o ambiente extracelular muda de conter pelo menos 10 mM ou 5 mM de nitrogênio para não conter nitrogênio. Em modalidades adicionais o promotor compreende um segmento de 50 ou mais nucleotídeos de um de SEQ ID Nos: 91-102, Em outras modalidades a célula tem uma sequência rRNA 23S com pelo menos 70, 75, 80, 85 ou 95% de identidade de nucleotídeo para uma ou mais das SEQ ID NOS: 11-19, Em outras modalidades o gene exógeno é integrado em um cromossomo da célula.

[008] Em modalidades adicionais de células da invenção, a célula é do gênero *Prototheca* e compreende um gene tioesterase ACP-acila graxa exógena e um perfil de lipídeo de pelo menos 4% C8-C14 de lipídeos totais

da célula, uma quantidade de C8 que é pelo menos 0,3% de lipídeos totais da célula, uma quantidade de C10 que é pelo menos 2% de lipídeos totais da célula, uma quantidade de C12 que é pelo menos 2% de lipídeos totais da célula, uma quantidade de C14 que é pelo menos 4% de lipídeos totais da célula, e uma quantidade de C8-C14 que é 10-30%, 20-30% ou pelo menos 10, 20 ou 30% dos lipídeos totais da célula. Em algumas modalidades a célula compreende ainda um gene de invertase sacarose exógena. Em algumas modalidades a célula é uma cepa da espécie *Prototheca moriformis*, *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora* ou *Prototheca zopfii*, e em outra modalidade a célula tem uma sequência rRNA 23S com pelo menos 70, 75, 80, 85 ou 95% de identidade nucleotídeo para uma ou mais das SEQ ID NOS: 11-19, Em outras modalidades o gene tioesterase ACP-acila graxa exógena é integrada em um cromossomo da célula. Outras modalidades da invenção compreendem métodos de fazer composições de triglicerídeo de um perfil de lipídeo de pelo menos 4% C8-C14 peso/peso ou percentagem de área da composição de triglicerídeo, uma quantidade de C8 que é pelo menos 0,3% peso/peso ou percentagem de área, uma quantidade de C10 que é pelo menos 2% peso/peso ou percentagem de área, uma quantidade de C12 que é pelo menos 2% peso/peso ou percentagem de área, uma quantidade de C14 que é pelo menos 4% peso/peso ou percentagem de área, e uma quantidade de C8-C14 que é 10-30%, 20-30% ou pelo menos 10, 20, ou 30% peso/peso ou percentagem de área. A invenção também compreende métodos de fazer composições de triglicerídeo compreendendo cultivar as células acima, em que as células também compreendem um gene exógeno codificando uma invertase de sacarose e sacarose é fornecida como uma fonte de carbono. Em algumas modalidades a invertase de sacarose tem pelo menos 50, 60, 70, 80, ou 90% de identidade de aminoácidos para uma ou mais das SEQ ID NOS: 3, 20-29 e 90.

[009] As modalidades da invenção incluem composições de óleo de

triglicerídeo bem como células contendo composições de óleo de triglicerídeo compreendendo um perfil de lipídeo de pelo menos 4% C8-C14 e um ou mais dos seguintes atributos: 0,1 a 0,4 micrograma/ml de carotenóides totais, menos de 0,4 microgramas/ml de carotenóides totais, menos de 0,001 micrograma/ml de licopeno; menos de 0,02 micrograma/ml de beta caroteno, menos de 0,02 miligrama de clorofila por quilograma de óleo; 0,40 a 0,60 miligrama de gama tocoferol por 100 gramas de óleo; 0,2 a 0,5 miligrama de tocotrienóis totais por grama de óleo, menos de 0,4 miligrama de tocotrienóis totais por grama de óleo, 4 a 8 mg por 100 gramas de óleo de campesterol, e 40 a 60 mg por 100 gramas de óleo de estigmasterol. Em algumas modalidades da invenção as composições de óleo de triglicerídeo têm um perfil de lipídeo de pelo menos 4% C8-C14 peso/peso ou percentagem de área da composição de triglicerídeo, uma quantidade de C8 que é pelo menos 0,3% peso/peso ou percentagem de área, uma quantidade de C10 que é pelo menos 2% peso/peso ou percentagem de área, uma quantidade de C12 que é pelo menos 2% peso/peso ou percentagem de área, uma quantidade de C14 que é pelo menos 4% peso/peso ou percentagem de área, e uma quantidade de C8-C14 que é de 10 a 30%, 20 a 30% ou pelo menos 10, 20 ou 30% peso/peso ou percentagem de área. Em outras modalidades a composição de óleo de triglicerídeo é misturada com pelo menos outra composição selecionada do grupo que consiste em soja, semente de colza, canola, palma, semente de palma, coco, milho, refugo de vegetal, sebo chinês, azeitona, girassol, semente de algodão, gordura de galinha, sebo de boi, sebo de porco, microalgas, macroalgas, *Cuphea*, linho, amendoim, graxa branca de escolha, banha, *Camelina sativa*, castanha de caju semente de mostarda, aveias, tremoço, kenaf, calendula, cânhamo, café, linhaça (linho), avelã, euforbia, semente de abobora, pecan, jojoba, jatrpfa, macadamia, castanhas do pará, abacate, petróleo, ou uma fração destilada de quaisquer dos óleos anteriores.

[0010]

Os métodos da invenção também incluem processar os óleos

acima mencionados por executar uma ou mais reações químicas da lista que consistem e transesterificação, hidrogenação, hidrocraqueamento, desoxigenação, isomerização, interesterificação, hidroxilação, hidrólise para fornecer ácidos graxos livres, e saponificação. A invenção também inclui combustíveis de hidrocarboneto feitos de hidrogenação e isomerização dos óleos acima mencionados e ésteres de alquila de ácido graxo feitos de transesterificação dos óleos acima mencionados. Em algumas modalidades o combustível de hidrocarboneto é feito de triglicerídeo isolado de células do gênero *Prototheca* em que a faixa de destilação T10 a T90 ASTM D86 é pelo menos 25°C. Em outras modalidades o combustível de éster de alquila de ácido graxo é feito de triglicerídeo isolado de células do gênero *Prototheca*, em que a composição tem um tempo de embeber frio A1 ASTM D6751 menor do que 120 segundos.

[0011] A invenção também inclui composições compreendendo (a) polissacarídeo compreendendo um ou mais monossacarídeos da lista que consiste em 20 a 30 moles em porcentagem de galactose, 55 a 65 moles em porcentagem de glicose; e 5 a 15 moles em porcentagem de manose; (b) proteína; e (c) DNA compreendendo uma sequência rRNA 23S com pelo menos 70, 75, 80, 85, ou 95% de identidade de nucleotídeos para uma ou mais das SEQ ID NOS: 11-19; e (d) um gene exógeno. Em algumas modalidades o gene exógeno é selecionado de uma invertase de sacarose e uma tioesterase ACP-acila graxa, e em modalidades adicionais a composição compreende ainda lipídeo com um perfil de lipídeo de pelo menos 4% C8-C14. Em outras modalidades a composição é formulada para consumo como uma ração de animal.

[0012] A invenção inclui ácidos nucleicos recombinantes codificando promotores que são regulados ascendentes em resposta à redução ou eliminação de nitrogênio no meio de cultura de uma célula do gênero *Prototheca*, como pelo menos uma regulação ascendente de 3 vezes como

determinado por abundância de transcrito quando o ambiente extracelular muda de conter pelo menos 10 mM ou 5 mM de nitrogênio para não conter nitrogênio. Em algumas modalidades o ácido nucléico recombinante compreende um segmento de 50 ou mais nucleotídeos de uma das SEQ ID NOS: 91-102, A invenção também inclui vetores de ácido nucléico compreendendo um cassete de expressão que compreende (a) um promotor que é ativo em uma célula do gênero *Prototheca*; e (b) uma sequência de codificação em ligação operável com o promotor em que a sequência de codificação contém o mais ou o segundo mais preferido códon da tabela 1 para pelo menos 20, 30, 40, 50, 60 ou 80% dos códons da sequência de codificação. Em alguns vetores a sequência de codificação compreende uma sequência de direcionamento para plastídio em quadro com uma tioesterase ACP-acila graxa, incluindo tioesterase que têm atividade de hidrólise em direção a um ou mais substratos ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C8, C10, C12 ou C14, Alguns vetores incluem sequências de direcionamento para plastídio que codificam peptídeos que são capazes de direcionar uma proteína ao plastídio de uma célula do gênero *Prototheca*, incluindo aqueles de microalgas e aqueles em que a sequência de direcionamento para plastídio tem pelo menos 20, 25, 35, 45, ou 55% de identidade de sequência de aminoácidos para uma ou mais das SEQ ID NOS. 127 – 133 e é capaz de direcionar uma proteína para o plastídio de uma célula do gênero *Prototheca*. Vetores adicionais da invenção compreendem sequências de ácido nucléico endógenas ao genoma nuclear de uma célula do gênero *Prototheca*, em que a sequência tem pelo menos 200 nucleotídeos de comprimento, e alguns vetores compreendem primeira e segunda sequências de ácidos nucléicos endógenas ao genoma nuclear de uma célula do gênero *Prototheca*, em que as primeira e segunda sequências (a) tem individualmente pelo menos 200 nucleotídeos de comprimento; (b) flanqueiam o cassete de expressão; e (c) são localizados no mesmo cromossomo de *Prototheca* não separados em mais do que 5, 10, 15,

20 e 50 kB.

[0013] A invenção também inclui um ácido nucléico recombinante com pelo menos 80, 90, 95 ou 98% de identidade de nucleotídeos para uma ou ambas das SEQ ID NOS: 134-135 e um ácido nucléico recombinante que codificam uma proteína com pelo menos 80, 90, 95 ou 98% de identidade de aminoácidos para uma ou ambas de SEQ ID NOS: 136-137.

[0014] A invenção também compreende métodos de produzir composições de triglicerídeo, compreendendo (a) cultivar uma população de células do gênero *Prototheca* na presença de uma fonte de carbono fixa, em que: (i) as células contêm um gene exógeno; (ii) as células acumulam pelo menos 10, 20, 30, 40, 60 ou 70% de seu peso de célula seco como lipídeo; e (iii) a fonte de carbono fixo é selecionada do grupo que consiste em sorgo e material celulósico despolimerizado; e (b) isolar componentes de lipídeo dos microorganismos cultivados. Em algumas modalidades a fonte de carbono fixo é material celulósico despolimerizado selecionado do grupo que consiste em forragem de milho, *Miscanthus*, sorgo de forragem, polpa de beterraba e bagaço de cana de açúcar, opcionalmente que foi submetido à lavagem com água antes da etapa de cultivo. Em alguns métodos a fonte de carbono fixo é material celulósico despolimerizado e o nível de glicose do material celulose despolimerizado é concentrado em um nível de pelo menos 300 g/litro, pelo menos 400g/litro, pelo menos 500 g/litro, ou pelo menos 600 g/litro antes da etapa de cultivo e é alimentado à cultura com o passar do tempo à medida que as células crescem e acumulam lipídeo. Em alguns métodos o gene exógeno codifica uma tioesterase ACP-acila graxa que tem atividade de hidrólise em direção a um ou mais substratos ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C8, C10, C12 ou C14, e em alguns métodos o triglicerídeo tem um perfil de lipídeo de pelo menos 4% C8-C14 e um ou mais dos seguintes atributos: 0,1 a 0,4 micrograma/ml de carotenóides totais; menos de 0,02 miligrama de clorofila por quilograma de óleo; 0,40 a 0,60 miligrama de gama tocoferol por

100 gramas de óleo; 0,2 a 0,5 miligrama de tocotrienóis totais por grama de óleo, 4 a 8 mg por 100 gramas de óleo de campesterol, e 40 a 60 mg por 100 gramas de óleo de estigmasterol.

[0015] Métodos adicionais da invenção incluem produzir uma composição de triglicerídeo, compreendendo: (a) cultivar uma população de microorganismos na presença de material celulose despolimerizado, em que: (i) o material celulósico despolimerizado é submetido à lavagem com água antes da etapa de cultivo; (ii) as células acumulam pelo menos 10, 20, 30, 40, 60 ou 70% de seu peso de célula seco como lipídeo; e (iii) o material celulósico despolimerizado é concentrado a pelo menos 300, 400, 500 ou 600 g/litro de glicose antes da etapa de cultivo; (iv) os microorganismos são cultivados em uma reação de batelada alimentada na qual material celulósico despolimerizado de pelo menos 300, 400, 500 ou 600 g/litro de glicose é alimentado aos microorganismos; e (b) isolar componentes de lipídeo dos microorganismos cultivados. Em algumas modalidades a fonte de carbono fixo é material celulósico despolimerizado selecionado do grupo que consiste em forragem de milho, *Miscanthus*, sorgo de forragem, polpa de beterraba e bagaço de cana de açúcar. Em modalidades adicionais os microorganismos são uma espécie do gênero *Prototheca* e contêm um gene exógeno, incluindo uma tioesterase ACP-acila graxa que tem atividade de hidrólise em direção a um ou mais substratos ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C8, C10, C12 ou C14. Um método adicional da invenção compreende fabricar óleo de triglicerídeo compreendendo cultivar uma célula que tem uma sequência rRNA 23S com pelo menos 90% ou 96% de identidade de nucleotídeo para SEQ ID NO: 30 na presença de sacarose como uma fonte de carbono.

[0016] A invenção também inclui métodos de fabricar um produto químico compreendendo executar uma ou mais reações químicas da lista que consiste em transesterificação, hidrogenação, hidrocraqueamento, desoxigenação, isomerização, interesterificação, hidroxilação, hidrólise e



saponificação em um óleo de triglicerídeo, em que o óleo tem um perfil de lipídeo de pelo menos 4% C8-C14 e um ou mais dos seguintes atributos: 0,1 a 0,4 microgramas/ml de carotenóides totais; menos de 0,02 miligramas de clorofila por quilograma de óleo; 0,10 a 0,60 miligramas de gama tocoferol por 100 gramas de óleo; 0,1 a 0,5 miligramas de tocotrienóis totais por grama de óleo, 1 a 8 mg por 100 gramas de óleo de campesterol, e 10 a 60 mg por 100 gramas de óleo de estigmasterol. Alguns métodos são realizados por fabricar o óleo por cultivar uma célula do gênero *Prototheca* que compreende um gene trioesterase ACP-acila graxa exógena que codifica um tioesterase ACP-acila graxa tendo atividade de hidrólise no sentido de um ou mais substratos ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C8, C10, C12 ou C14. Em alguns métodos a reação de hidrólise é selecionada do grupo que consiste em saponificação, hidrólise de ácido, hidrólise alcalina, hidrólise enzimática, hidrólise catalítica, e hidrólise de água comprimida quente, incluindo uma reação de hidrólise catalítica em que o óleo é dividido em glicerol e ácidos graxos. Em métodos adicionais os ácidos graxos são submetidos a uma reação de aminação para produzir compostos de nitrogênio graxo ou uma reação de ozonólise para produzir ácidos mono- e dibásicos. Em algumas modalidades o óleo é submetido a um método de divisão de triglicerídeo selecionado do grupo que consiste em divisão enzimática e divisão por pressão. Em alguns métodos uma reação de condensação segue a reação de hidrólise outros métodos incluem executar uma reação de hidroprocessamento no óleo, opcionalmente em que o produto da reação de hidroprocessamento é submetido a uma reação de desoxigenação ou uma reação de condensação antes de ou simultaneamente com a reação de hidroprocessamento. Alguns métodos incluem adicionalmente uma reação de remoção de gás. Métodos adicionais incluem processar os óleos acima mencionados por executar uma reação de desoxigenação selecionada do grupo que consiste em: uma reação de hidrogenólise, hidrogenação, uma reação de hidrogenólise-hidrogenação

consecutiva, uma reação de hidrogenação-hidrogenólise consecutiva, e uma reação de hidrogenólise-hidrogenação combinada. Em alguns métodos uma reação de condensação segue a reação de desoxigenação. Outros métodos incluem executar uma reação de esterificação nos óleos acima mencionados, opcionalmente uma reação de interesterificação ou uma reação de transesterificação. Outros métodos incluem executar uma reação de hidroxilação nos óleos acima mencionados, opcionalmente em que uma reação de condensação segue a reação de hidroxilação.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[0017] As Figuras 1 e 2 ilustram as curvas de crescimento de espécie *Prototheca* e cepa *Chlorella luteoviridis* SAG 2214 crescida em sorgo como a fonte de carbono.

[0018] A Figura 3 mostra crescimento de curso de tempo de SAG 2214 em glicose e sacarose.

[0019] A Figura 4 mostra mapas dos cassetes utilizando transformações em *Prototheca*, como descrito no exemplo 3.

[0020] A Figura 5 mostra os resultados de análise Southern blot em três transformantes de cepa UTEX 1435, como descrito no exemplo 3.

[0021] A Figura 6 mostra um diagrama esquemático do construto de transgene de (invertase de sacarose de levedura (ylnv)) suc 2 otimizado em códon e não otimizada em códon. Os sítios de clonagem de restrição relevantes são indicados e as setas indicam a direção de transcrição.

[0022] A Figura 7a mostra os resultados de *Prototheca moriformis* crescido em açúcares derivados de celulose (forragem de milho, polpa de beterraba, cana de sorgo, Miscanthus e controle de glicose). O crescimento é expresso em medições de densidade óptica (leituras A750).

[0023] A Figura 7b mostra os resultados de experimentos de crescimento utilizando *Prototheca moriformis* utilizando níveis diferentes de açúcar celulósico derivado de forragem de milho como comparado com

controle de xilose/glicose.

[0024] A Figura 7c mostra o impacto que xilose tem sobre a produção de lipídeo em culturas de *Prototheca*.

[0025] A Figura 7d mostra o impacto de concentração de sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e antiespuma no crescimento (em peso de célula seca (DCW)) de *Prototheca*.

[0026] A Figura 8 mostra o impacto de tratamento hidrotérmico de vários materiais celulósicos (bagaço de cana de açúcar, cana de sorgo, *Miscanthus* e polpa de beterraba) e o fluxo de açúcar resultante no crescimento de *Prototheca*.

[0027] A Figura 9 mostra níveis decrescentes de hidroximetilfurfurais (HMF) e furfurais em biomassa celulósica (bagaço de cana de açúcar, cana de sorgo, *Miscanthus* e polpa de beterraba) após ciclos repetidos de tratamento hidrotérmico.

[0028] A Figura 10 mostra um diagrama esquemático de um processo de sacarificação de materiais celulósicos para gerar fluxos de açúcar apropriados para uso em produção de óleo heterotrófico em um fermentador.

[0029] A Figura 11 mostra níveis decrescentes de HMF e furfurais em bagaço de cana de açúcar explodido após ciclos repetidos de tratamento hidrotérmico.

[0030] A Figura 12 mostra um diagrama esquemático de construtos de tioesterase utilizados em transformações de *Prototheca*. Os promotores de beta-tubulina heterólogos ( $\text{Neo}^R$  de acionamento) e desidrogenase de glutamato são derivados de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Chlorella sorokiniana*, respectivamente. 3'UTR reductase de nitrato foi derivado de *Chlorella vulgaris*. Os sítios de clonagem de restrição relevantes são indicados e setas indicam a direção de transcrição.

[0031] A Figura 13 mostra um cromatograma de diesel renovável produzido de óleo de triglicerídeo *Prototheca*.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0032] A presente invenção se origina da descoberta de que *Prototheca* e certos microorganismos relacionados têm propriedades inesperadamente vantajosas para a produção de óleos, combustíveis e outras composições de lipídeo ou hidrocarboneto economicamente e em grandes quantidades, bem como da descoberta de métodos e reagentes para geneticamente alterar esses microorganismos para melhorar essas propriedades. Os óleos produzidos por esses microorganismos podem ser utilizados no combustível de transporte, indústrias petroquímica, e/ou alimentícia e cosmética, entre outras aplicações. A transesterificação de lipídeos fornece ésteres de ácido graxo de cadeia longa úteis como biodiesel. Outros processos enzimáticos e químicos podem ser moldados para fornecer ácidos graxos, aldeídos, alcoóis, alcanos e alcenos. Em algumas aplicações, diesel renovável, combustível de jato, ou outros compostos de hidrocarboneto são produzidos. A presente invenção também provê métodos de cultivo microalgas para produtividade aumentada e rendimento aumentado de lipídeos, e/ou para produção mais eficaz em termos de custo das composições descritas aqui.

[0033] Essa descrição detalhada da invenção é dividida em seções para conveniência do leitor. A seção I provê definições em termos usados aqui. A seção 2 provê uma descrição de condições de cultura úteis nos métodos da invenção. A seção 3 provê uma descrição de métodos e materiais de engenharia genética. A seção 4 provê uma descrição de engenharia genética de *Prototheca* para permitir utilização de sacarose. A seção 5 provê uma descrição de engenharia genética de *Prototheca* para modificar biossíntese de lipídeo. A seção 6 descreve métodos para fazer combustíveis e produtos químicos. A seção 7 revela exemplos e modalidades da invenção. A descrição detalhada invenção é seguida por exemplos que ilustram os vários aspectos e modalidades da invenção.

## I. DEFINIÇÕES

[0034] A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o significado comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual essa invenção pertence. As seguintes referências fornecem a uma pessoa versada com uma definição geral de muitos dos termos utilizados nessa invenção: Singleton *e outros.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (2nd ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *The Glossary of Genetics*, 5ª Ed., R. Rieger *e outros.* (eds.), Springer Verlag (1991); e Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). Como utilizado aqui, os seguintes termos têm os significados atribuídos aos mesmos a menos que especificado de outro modo.

[0035] “Ativo em microalgas” se refere a um ácido nucléico que é funcional em microalgas. Por exemplo, um promotor que foi utilizado para acionar um gene de resistência a antibiótico para transmitir resistência a antibiótico a uma microalga transgênica é ativo em microalgas.

[0036] “Proteína portadora de acila” ou “ACP” é uma proteína que liga uma cadeia de acila em crescimento durante síntese de ácido graxo como um éster tiol no tiol distal da fração 4'-fosfopanteteína e compreende um componente do complexo de sintase de ácido graxo.

[0037] “Molécula de CoA-acila” ou “acila-CoA” é uma molécula compreendendo uma fração de acila fixada covalentemente à coenzima A através de uma ligação de éster tiol no tiol distal da fração 4'-fosfopanteteína de coenzima A.

[0038] “Percentagem de área” se refere à área de picos observados utilizando métodos de detecção GC/FID FAME nos quais todo ácido graxo na amostra é convertido em um éster metílico de ácido graxo (FAME) antes da detecção. Por exemplo, um pico separado é observado para um ácido graxo de 14 átomos de carbono sem insaturação (C14:0) em comparação com qualquer outro ácido graxo como C14:1. A área de pico para cada classe de FAME é

diretamente proporcional a sua percentagem de composição na mistura e é calculada com base na soma de todos os picos presentes na amostra (isto é, [área sob pico específico/ área total de todos os picos medidos] x 100). Ao se referir a perfis de lipídeo de óleos e células da invenção, “pelo menos 4% C8-C14” significa que pelo menos 4% do total de ácidos graxos na célula ou na composição de glicerolipídeo extraída têm um comprimento de cadeia que inclui 8, 10, 12 ou 14 átomos de carbono.

[0039] “Axênico” é uma cultura de um organismo isento de contaminação por outros organismos vivos.

[0040] “Biodiesel” é um éster de alquila de ácido graxo biologicamente produzido apropriado para uso como um combustível em um motor diesel.

[0041] “Biomassa” é um material produzido por crescimento e/ou propagação de células. Biomassa pode conter células e/ou conteúdo intracelular bem como material extracelular, inclui, porém não é limitado a, compostos secretados por uma célula.

[0042] “Biorreator” é um invólucro ou invólucro parcial no qual células são cultivadas, opcionalmente em suspensão.

[0043] “Catalisador” é um agente, como uma molécula ou complexo macromolecular, capaz de facilitar ou promover uma reação química de um reagente a um produto sem se tornar uma parte do produto. Um catalisador aumenta a taxa de uma reação, após o que, o catalisador pode atuar em outro reagente para formar o produto. Um catalisador diminui genericamente a energia de ativação geral exigida para a reação de tal modo que prossegue mais rapidamente ou em uma temperatura inferior. Desse modo, um equilíbrio de reação pode ser obtido mais rapidamente. Os exemplos de catalisadores incluem enzimas, que são catalisadores biológicos; calor, que é um catalisador não biológico; e metais utilizados em processos de refinação de óleo fóssil.

[0044] “Material celulósico” é o produto de digestão de celulose,

incluindo glicose e xilose, e compostos adicionais opcionalmente como dissacarídeos, oligossacarídeos, lignina, furfurais e outros compostos. Exemplos não limitadores de fontes de material celulósico incluem bagaços de cana de açúcar, polpa de beterraba, forragem de milho, aparas de madeira, pó de serra e switchgrass.

[0045] “Co-cultura”, e variantes da mesma como “co-cultivar” e “co-fermentar”, se referem à presença de dois ou mais tipos de células no mesmo biorreator. Os dois ou mais tipos de células podem ambos ser microorganismos, como microalgas, ou podem ser uma célula de microalgas cultivada com um tipo de célula diferente. As condições de cultura podem ser aquelas que favorecem crescimento e/ou propagação dos dois ou mais tipos de células ou aqueles que facilitam crescimento e/ou proliferação de um, ou um subconjunto, de duas ou mais células enquanto mantém crescimento celular para o restante.

[0046] “Cofator” é qualquer molécula diferente do substrato, exigida para uma enzima realizar sua atividade enzimática.

[0047] “DNA complementar” ou “nDNA” é uma cópia de DNA de mRNA, normalmente obtida por transcrição inversa de RNA mensageiro (mRNA) ou amplificação (por exemplo, através de reação de cadeia de polimerase (“PCR”).

[0048] “Cultivado” e variantes do mesmo como “cultivado” e “fermentado”, se referem à promoção intencional de crescimento (aumentos em tamanho de célula, teores celulares e/ou atividade celular) e/ou propagação (aumentos em números de célula através de mitose) de uma ou mais células pelo uso de condições selecionadas e/ou controladas. A combinação tanto de crescimento como de propagação pode ser denominada proliferação. Os exemplos de condições selecionadas e/ou controladas incluem o uso de um meio definido (com características conhecidas com pH, resistência iônica, e fonte de carbono), temperatura especificada, tensão de

oxigênio, níveis de dióxido de carbono, e crescimento em um biorreator. Cultivar não se refere ao crescimento ou propagação de microorganismos em natureza ou de outro modo sem intervenção humana; por exemplo, crescimento natural de um organismo que se torna finalmente fossilizado para produzir óleo bruto geológico não é cultivo.

[0049] “Citólise” é a lise de células em um ambiente hipotônico. A citólise é causada por osmose excessiva, ou movimento de água, em direção ao interior de uma célula (hiperidratação). A célula não pode resistir à pressão osmótica da água no interior, e assim explode.

[0050] “Farelo deslipidado” e “biomassa microbiana deslipidada” é biomassa microbiana após o óleo (incluindo lipídeos) ter sido extraído ou isolado da mesma, através do uso de extração mecânica (isto é, exercida por uma prensa expelidora) ou por solvente ou ambos. Farelo deslipidado tem uma quantidade reduzida de óleo/lipídeos em comparação com antes da extração ou isolamento de óleo/lipídeos da biomassa microbiana porém contém algum óleo residual/lipídeo.

[0051] “Vetor de expressão” ou “construto de expressão” ou “plasmídeo” ou “construto de DNA recombinante” se refere a um ácido nucléico que foi gerado através de intervenção humana, incluindo por meio recombinante ou síntese química direta, com uma série de elementos de ácido nucléico especificados que permitem transcrição e/ou tradução de um ácido nucléico específico em uma célula hospedeira. O vetor de expressão pode ser parte de um plasmídeo, vírus ou fragmento de ácido nucléico. Tipicamente, o vetor de expressão inclui um ácido nucléico a ser transcrito operativamente ligado a um promotor.

[0052] “Gene exógeno” é um ácido nucléico que codifica para a expressão de um RNA e/ou proteína que foi introduzida (“transformada”) em uma célula. Uma célula transformada pode ser mencionada como uma célula recombinante, na qual gene(s) exógeno(s) adicionais podem ser introduzidos.



O gene exógeno pode ser de uma espécie diferente (e assim heterólogo) ou da mesma espécie (e assim homólogo) em relação à célula sendo transformada. Desse modo, um gene exógeno pode incluir um gene homólogo que ocupa um local diferente no genoma da célula ou está sob controle diferente, em relação à cópia endógena do gene. Um gene exógeno pode estar presente em mais de uma cópia na célula. Um gene exógeno pode ser mantido em uma célula como uma inserção no genoma ou como uma molécula episomal.

[0053] “Fornecido de forma exógena” se refere a uma molécula fornecida ao meio de cultura de uma cultura de célula.

[0054] “Prensagem em expelidor” é um método mecânico para extrair óleo de matérias primas como sojas e semente de colza. Uma prensa expelidora é uma máquina do tipo parafuso, que pressiona material através de uma cavidade semelhante a barril em gaiola. Matérias primas entram em um lado da prensa e massa usada sai do outro lado enquanto o óleo vaza para fora entre as barras na gaiola e é coletado. A máquina utiliza fricção e pressão contínua dos acionamentos de parafuso para mover e comprimir a matéria-prima. O óleo vaza através de pequenas aberturas que não permitem passagem de sólidos. À medida que a matéria-prima é prensada, a fricção faz com que a mesma tipicamente aqueça.

[0055] “Tioesterase ACP-acila graxa” é uma enzima que catalisa a clivagem de um ácido graxo de uma proteína portadora de acila (ACP) durante síntese de lipídeo.

[0056] “Reductase de aldeído/CoA-acila graxa” é uma enzima que catalisa a redução de uma molécula CoA-acila para um álcool primário.

[0057] “Reductase CoA-acila graxa” é uma enzima que catalisa a redução de uma molécula de CoA-acila para um aldeído.

[0058] “Descarbonilase de aldeído graxo” é uma enzima que catalisa a conversão de um aldeído graxo em um alcano.

[0059] “Reductase de aldeído graxo” é uma enzima que catalisa a

redução de um aldeído a um álcool primário.

[0060] “Fonte de carbono fixa” é uma molécula(s) que contém carbono, tipicamente uma molécula orgânica, que está presente em temperatura e pressão ambiente em forma sólida ou líquida em um meio de cultura que pode ser utilizado por um microorganismo cultivado na mesma.

[0061] “Homogeneizado” é biomassa que foi fisicamente rompida.

[0062] “Hidrocarboneto” é (a) uma molécula contendo somente átomos de carbono e hidrogênio em que os átomos de carbono são covalentemente ligados para formar uma espinha dorsal cíclica ou parcialmente cíclica, linear, ramificada, à qual os átomos de hidrogênio são ligados. A estrutura molecular de compostos de hidrocarboneto varia da mais simples, na forma de metano ( $\text{CH}_4$ ), que é um constituinte de gás natural, até a muito pesada e muito complexa, como algumas moléculas como asfaltenos encontrados em óleo bruto, petróleo e betumes. Hidrocarbonetos podem estar em forma gasosa, líquida ou sólida, ou qualquer combinação dessas formas, e podem ter uma ou mais ligações duplas ou triplas entre átomos de carbono adjacentes na espinha dorsal. Por conseguinte, o termo inclui alcanos cíclicos ou parcialmente cíclicos, lineares, ramificados, alcenos, lipídeos e parafinas. Os exemplos incluem propano, butano, pentano, hexano, octano e esqualeno.

[0063] “Razão de hidrogênio:carbono” é a razão de átomos de hidrogênio para átomos de carbono em uma molécula em uma base de átomo para átomo. A razão pode ser utilizada para se referir ao número de átomos de carbono e hidrogênio em uma molécula de hidrocarboneto. Por exemplo, o hidrocarboneto com a razão mais elevada é metano  $\text{CH}_4$  (4:1).

[0064] “Fração hidrofóbica” é a porção, 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 normalmente não polar.

[0065] “Rendimento aumentado de lipídeo” se refere a um aumento

na produtividade de uma cultura microbiana, por exemplo, por aumentar o peso seco de células por litro de cultura, aumentar a percentagem de células que constituem lipídeo, ou aumentar a quantidade geral de lipídeo por litro de volume de cultura por tempo unitário.

[0066] “Promotor induzível” é um promotor que media transcrição de um gene operativamente ligado em resposta a um estímulo específico.

[0067] “Em ligação operável” é uma ligação funcional entre duas sequências de ácido nucléico, como sequência de controle (tipicamente um promotor) e a sequência ligada (tipicamente uma sequência que codifica uma proteína, também chamada uma sequência de codificação). Um promotor está em ligação operável com um gene exógeno se puder mediar transcrição do gene.

[0068] “In situ” significa “no lugar” ou “em sua posição original”.

[0069] “Concentração de limitação de um nutriente” é uma concentração de um composto em uma cultura que limita a propagação de um organismo cultivado. Uma “concentração não limitadora de um nutriente” é uma concentração que suporta propagação máxima durante um dado período de cultura. Desse modo, o número de células produzidas durante um dado período de cultura é mais baixo na presença de uma concentração de limitação de um nutriente do que quando o nutriente é não limitador. Diz-se que um nutriente está “em excesso” em uma cultura, quando o nutriente está presente em uma concentração maior do que aquela que suporta propagação máxima.

[0070] “Lipase” é uma enzima solúvel em água que catalisa a hidrólise de ligações de éster em substratos de lipídeo insolúveis em água. Lípases catalisam a hidrólise de lipídeos em gliceróis e ácidos graxos.

[0071] “Enzima de modificação de lipídeo” se refere a uma enzima que altera a estrutura covalente de um lipídeo. Os exemplos de enzimas de modificação de lipídeo incluem uma lípase, uma tioesterase ACP-acila graxa, uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa, uma reductase de CoA-acila

graxa, uma reductase de aldeído graxo, e uma decarbonilase de aldeído graxo.

[0072] “Enzima de via de lipídeo” é qualquer enzima que desempenha um papel em metabolismo de lipídeo, isto é, síntese, modificação ou degradação de lipídeo, e quaisquer proteínas que modificam quimicamente lipídeos, bem como proteínas portadoras.

[0073] “Lipídeos” são uma classe de moléculas que são solúveis em solventes não polares (como éter e clorofórmio) e são relativamente ou totalmente insolúveis em água. Moléculas de lipídeo têm essas propriedades, porque consistem amplamente em caudas de hidrocarboneto longas que são de natureza hidrofóbica. Os exemplos de lipídeos incluem ácidos graxos (saturados e insaturados); glicerídeos ou glicerolipídeos (como monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos ou gorduras neutras, e fosfoglicerídeos ou glicerofosfolipídeos); nonglicerídeos (esfingolipídios, lipídeos de esteroide incluindo colesterol e hormônios de esteroide, lipídeos de prenol incluindo terpenóides, alcoóis graxos, ceras e policetídeos); e derivados de lipídeo complexos (lipídeos ligados por açúcar, ou glicolipídeos, e lipídeos ligados por proteína). “Gorduras” são um subgrupo de lipídeos chamado “triacilglicerídeos.”

[0074] “Lisado” é uma solução contendo o conteúdo de células lisadas.

[0075] “Lise” é a ruptura da membrana de plasma e opcionalmente a parede de célula de um organismo biológico suficiente para liberar pelo menos um pouco do conteúdo intracelular, frequentemente por mecanismos mecânico, viral ou osmótico que comprometem sua integridade.

[0076] “Lisar” é romper a membrana celular e opcionalmente a parede da célula de um organismo biológico ou célula suficiente para liberar pelo menos um pouco do conteúdo intracelular.

[0077] “Microalgas” é um organismo microbiano eucariótico que contém um cloroplasto ou plastídio, e opcionalmente que é capaz de executar

fotossíntese, ou um organismo microbiano procariótico capaz de executar fotossíntese. Microalgas incluem fotoautotrofos obrigados, que não podem metabolizar uma fonte de carbono fixa como energia, bem como heterótrofos, que podem viver exclusivamente de uma fonte de carbono fixa. Microalgas incluem organismos unicelulares que separam de células irmãs logo após a divisão das células, como *Chlamydomonas*, bem como micróbios como, por exemplo, *Volvox*, que é um micróbio fotossintético multicelular simples de dois tipos de células distintas. Microalgas incluem células como *Chlorella*, *Dunaliella* e *Prototheca*. Microalgas também incluem outros organismos fotossintéticos microbianos que apresentam adesão de célula-célula, como *Agmenellum*, *Anabaena* e *Pyrobotrus*. Microalgas também incluem microorganismos heterotróficos obrigados que perderam a capacidade de executar fotossíntese, como certas espécies de algas dinoflagellate e espécies do gênero *Prototheca*.

[0078] “Microorganismo” e “micróbio” são organismos unicelulares microscópicos.

[0079] “Naturalmente coexpresso” com referência a duas proteínas ou genes significa que as proteínas ou seus genes são coexpressos naturalmente em um tecido ou organismo do qual são derivados, por exemplo, porque os genes que codificam as duas proteínas estão sob o controle de uma sequência reguladora comum ou porque são expressos em resposta ao mesmo estímulo.

[0080] “Choque osmótico” é a ruptura de células em uma solução após uma redução súbita em pressão osmótica. Choque osmótico é às vezes induzido para liberar componentes celulares de tais células em uma solução.

[0081] “Enzima de degradar polissacarídeos” é qualquer enzima capaz de catalisar a hidrólise, ou sacarificação, de qualquer polissacarídeo. Por exemplo, celulasas catalisam a hidrólise de celulose.

[0082] “Polissacarídeos” ou “glicanos” são carboidratos compostos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Celulose é um

polissacarídeo que compõem certas paredes de célula de planta. Celulose pode ser despolimerizada por enzimas para fornecer monossacarídeos como xilose e glicose, bem como dissacarídeos e oligossacarídeos maiores.

[0083] “Promotor” é uma sequência de controle de ácido nucléico que orienta a transcrição de um ácido nucléico. Como utilizado aqui, um promotor inclui sequências de ácido nucléicas necessárias próximas ao sítio de partida de transcrição, como, no caso de um promotor do tipo polimerase II, um elemento TATA. Um promotor também inclui opcionalmente elementos intensificadores ou repressores distais, que podem ser localizados tantos quanto vários ilhares de pares base do sítio de partida de transcrição.

[0084] “Recombinante” é uma célula, ácido nucléico, proteína ou vetor, que foi modificado devido à introdução de um ácido nucléico exógeno ou a alteração de um ácido nucléico nativo. Desse modo, por exemplo, células recombinantes expressam genes que não são encontrados na forma nativa (não recombinante) da célula ou expressam genes nativos diferentemente daqueles genes são expressos por uma célula não recombinante. Um “ácido nucléico recombinante” é um ácido nucléico originalmente formado in vitro, em geral, pela manipulação de ácido nucléico, por exemplo, utilizando polimerases e endonucleases, ou de outro modo está em uma forma não encontrada normalmente na natureza. Ácidos nucléicos recombinantes podem ser produzidos, por exemplo, para colocar dois ou mais ácidos nucléicos em ligação operável. Desse modo, um ácido nucléico isolado ou um vetor de expressão formado in vitro por ligar moléculas de DNA que não são normalmente unidas em natureza, são ambos considerados recombinantes para fins da presente invenção. Após um ácido nucléico recombinante ser feito e introduzido em uma célula hospedeiro ou organismo, pode replicar utilizando maquinaria celular in vivo da célula hospedeira; entretanto, tais ácidos nucléicos, após serem produzidos de forma recombinante, embora subsequêntemente replicados intracelularmente, são ainda considerados

recombinantes para fins da presente invenção. Similarmente uma “proteína recombinante” é uma proteína feita utilizando técnicas recombinantes, isto é, através da expressão de um ácido nucléico recombinante.

[0085] “Diesel renovável” é uma mistura de alcanos (como C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 e C18:0) produzida através de hidrogenação e desoxigenação de lipídeos.

[0086] “Sacarificação” é um processo de converter biomassa, normalmente biomassa celulósica ou lignocelulósica em açúcares monoméricos, como glicose e xilose. Material celulósico “sacarificado” ou “despolimerizado” ou biomassa se refere a material celulósico ou biomassa que foi convertido em açúcares monoméricos através de sacarificação.

[0087] “Sonicação” é um processo de romper materiais biológicos, como uma célula, por uso de energia de onda sonora.

[0088] “Espécie de furfural” é 2-furancarboxaldeído ou um derivado que retém as mesmas características estruturais básicas.

[0089] “Forragem” são os talos e folhas secas de uma cultura que permanece após um grão ter sido colhido.

[0090] “Gene de utilização de sacarose” é um gene que quando expresso, auxilia a capacidade de uma célula utilizar sacarose como uma fonte de energia. Proteínas codificadas por um gene de utilização de sacarose são mencionadas aqui como “enzimas de utilização de sacarose” e incluem transportadores de sacarose, invertases de sacarose, e hexocinases como glucocinases e frutocinases.

## II. CULTIVO

[0091] A presente invenção refere-se genericamente ao cultivo de cepas de *Prototheca*, particularmente cepas de *Prototheca* recombinantes, para a produção de lipídeo. Para conveniência do leitor, essa seção é subdividida em subseções. A subseção 1 descreve espécie e cepas de *Prototheca* e como identificar novas espécies e cepas de *Prototheca* e

microalgas relacionadas por comparação genômica de DNA. A subseção 2 descreve biorreatores úteis para cultivo. A subseção 3 descreve meios para cultivo. A subseção 4 descreve produção de óleo de acordo com métodos de cultivo ilustrativos da invenção.

### 1. Espécie e cepas de *Prototheca*

[0092] *Prototheca* é um microorganismo notável para uso na produção de lipídeo, porque pode produzir níveis elevados de lipídeo, particularmente lipídeo apropriado para produção de combustível. O lipídeo produzido por *Prototheca* tem cadeias de hidrocarboneto de comprimento de cadeia mais curto e um grau de saturação mais elevado do que aquele produzido por outras microalgas. Além disso, o lipídeo de *Prototheca* é genericamente livre de pigmentos (níveis baixo a não detectável de clorofila e certos carotenóides) e em qualquer caso contém muito menos pigmento do que lipídeo de outras microalgas. Além disso, células de *Prototheca* recombinantes fornecidas pela invenção podem ser utilizadas para produzir lipídeo em rendimento e eficiência maiores, e com custo reduzido, em relação à produção de lipídeo de outros microorganismos. Cepas de *Prototheca* ilustrativas para uso nos métodos da invenção incluem, além disso, essa microalga cresce heterotroficamente e pode ser geneticamente construída como *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca stagnora* (incluindo UTEX 327), *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis* (incluindo cepas UTEX 1441, 1435), e *Prototheca zopfii*. Espécies do gênero *Prototheca* são heterótrofos obrigados.

[0093] A espécie de *Prototheca* para uso na invenção pode ser identificada por amplificação de certas regiões alvo do genoma. Por exemplo, a identificação de uma espécie ou cepa de *Prototheca* específica pode ser obtida através de amplificação e seqüenciamento de DNA nuclear e/ou cloroplasto utilizando iniciadores e metodologia utilizando qualquer região do genoma, por exemplo, utilizando os métodos descritos em Wu e outros, Bot.



Bull. Acad. Sin. (2001) 42:115-121, Identification of *Chlorella spp.* isolates using ribosomal DNA sequences. Métodos bem estabelecidos de análise filogenética, como amplificação e sequenciamentos de espaçador transcrito interno ribossomal (ITS1 e ITS2 rDNA), 23S rRNA, 18S rRNA e outras regiões geonômicas conservadas podem ser utilizados por aqueles versados na técnica para identificar espécie não somente de *Prototheca*, porém outros organismos que produzem lipídeo e hidrocarboneto com perfis de lipídeo similares e capacidade de produção. Para exemplos de métodos de identificação e classificação de algas, vide, também, por exemplo, *Genetics*, 2005 Agosto; 170(4):1601-10 e *RNA*, 2005 Abril;11(4):361-4.

[0094] Desse modo, a comparação de DNA genômico pode ser utilizada para identificar espécie apropriada de microalgas a serem utilizadas na presente invenção. Regiões de DNA genômico conservado como, porém não limitado a, DNA codificando para 23S rRNA, podem ser amplificadas de espécies de microalgas e comparadas com sequências de consenso para selecionar para espécies de microalgas que são relacionadas de forma taxonômica com as microalgas preferidas utilizadas na presente invenção. Os exemplos de tal comparação de sequência de DNA para espécies no gênero de *Prototheca* são mostrados abaixo. A comparação de DNA genômico pode ser também útil para identificar espécies de microalgas que foram identificadas erroneamente em uma coleção de cepas. Frequentemente uma coleção de cepas identificará espécies de microalgas com base em características morfológicas e fenotípicas. O uso dessas características pode levar a categorização errônea da espécie ou gênero de uma microalga. O uso de comparação de DNA genômico pode ser um método melhor de categorizar espécie de microalgas com base em sua relação filogenética.

[0095] Microalgas para uso na presente invenção têm tipicamente sequências de DNA genômico codificando para 23S rRNA que têm pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, ou pelo menos 85% de

identidade de nucleotídeo para pelo menos uma das sequências listadas na SEQ ID NOS: 11-19.

[0096] Para comparação de sequência para determinar a percentagem de identidade de aminoácido ou nucleotídeo, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência, com a qual sequências de teste são comparadas. Ao utilizar um algoritmo de comparação de sequências, sequências de referência e teste são entradas em um computador, coordenadas de subsequência são designadas, se necessário, e parâmetros de programa de algoritmo de sequência são designados. O algoritmo de comparação de sequência calcula então a percentagem de identidade de sequência para a(s) sequência(s) de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros de programa designados.

[0097] O alinhamento ótimo de sequências 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), pelo método de busca para similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou por inspeção visual (vide genericamente, Ausubel *e outros.*, *supra*).

[0098] Outro algoritmo de exemplo que é apropriado para determinar a percentagem de identidade de sequência e similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, que é descrito em Altschul *e outros.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Software para executar análises BLAST está disponível ao público através de e National Center for Biotechnology Information (no endereço da rede [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Esse algoritmo envolve identificar primeiramente pares de sequência de marcação elevada (HSPs) por identificar palavras curtas de comprimento W na sequência de consulta, que casam ou

atendem alguma marcação de limite de valor positivo T quando alinhado com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência de banco de dados. T é mencionado como o limite de marcação de palavra na vizinhança (Altschul e outros, supra). Esses hits de palavra da vizinhança, iniciais, atuam como sementes para iniciar buscas para encontrar HSPs mais longos contendo as mesmas. Os hits de palavra são então estendidos nas duas direções ao longo de cada sequência até onde a marcação de alinhamento cumulativo pode ser aumentada. Marcação cumulativa são calculadas utilizando, para sequências de nucleotídeo, os parâmetros M (marcação de recompensa para um par de resíduos casados; sempre  $> 0$ ) e N (marcação de penalidade para resíduos descasados; sempre  $< 0$ ). Para sequências de aminoácidos, uma matriz de marcação é utilizada para calcular a marcação cumulativa. A extensão dos hits de palavras em cada direção é parada quando: a marcação de alinhamento cumulativo cai pela quantidade X de seu valor máximo obtido; a marcação cumulativa vai para zero ou abaixo devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduo de marcação negativa; ou o término de qualquer sequência é atingido. Para identificar se um ácido nucléico ou polipeptídeo está compreendido no escopo da invenção, os parâmetros default dos programas BLAST são apropriados. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeo) utiliza como defaults um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10,  $M=5$ ,  $N=-4$ , e uma comparação das duas fitas. Para sequências de aminoácidos, o programa BLASTP utiliza como defaults um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e a matriz de marcação BLOSUM62. O programa TBLASTN (utilizando sequência de proteína para sequência de nucleotídeo) utiliza como defaults um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e uma matriz de marcação BLOSUM 62, (vide Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:10915 (1989)).

[0099] Além de calcular a percentagem de identidade de sequência, o

algoritmo BLAST também executa uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (vide, 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 um casamento entre duas sequências de aminoácidos ou nucleotídeos ocorreria por acaso. Por exemplo, um ácido nucléico é considerado similar a uma sequência de referência se a menor probabilidade de soma em uma comparação com ácido nucléico de teste para o ácido nucléico de referência for menor do que aproximadamente 0,1, mais preferivelmente menor do que aproximadamente 0,01, e mais preferivelmente menor do que aproximadamente 0,001,

[00100] Outras considerações que afetam a seleção de microorganismos para uso na invenção incluem, além da produção de lipídeos ou hidrocarbonetos apropriados para a produção de óleos, combustíveis e oleoquímicos: (1) teor elevado de lipídeo como percentagem de peso de célula; (2) facilidade de crescimento; (3) facilidade de engenharia genética; e (4) facilidade de processamento de biomassa. Em modalidades específicas, o microorganismo construído geneticamente ou do tipo selvagem fornece células que são pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65% ou pelo menos 70% ou mais de lipídeo. Organismos preferidos crescem heterotroficamente (em açúcares na ausência de luz).

## 2. Biorreator

[00101] Microorganismos são cultivados tanto para fins de conduzir manipulações genéticas e para produção de hidrocarbonetos (por exemplo, lipídeos, ácidos graxos, aldeídos, alcoóis e alcanos). O tipo anterior de cultura é conduzido em uma escala pequena e inicialmente, pelo menos sob condições nas quais o microorganismo de partida pode crescer. A cultura para fins de produção de hidrocarboneto é normalmente conduzida em uma escala

grande (por exemplo, 10,000 L, 40,000 L, 100,000 L ou biorreatores maiores) em um biorreator. *Prototheca* são tipicamente cultivadas nos métodos da invenção em meios líquidos em um biorreator. Tipicamente, o biorreator não permite entrada de luz.

[00102] O biorreator ou fermentador é utilizado para cultivar células de microalgas através das várias fases de seu ciclo fisiológico. Biorreatores oferecem muitas vantagens para uso em métodos de crescimento e propagação heterotróficos. Para produzir biomassa para uso em alimentos, microalgas são preferivelmente fermentadas em grandes quantidades em líquido, como em culturas de suspensão como exemplo. Biorreatores como fermentadores de aço podem acomodar volumes de cultura muito grandes (40.000 litros e biorreatores de capacidade maior são utilizados em várias modalidades da invenção). Biorreatores também permitem tipicamente o controle de condições de cultura como temperatura, pH, tensão de oxigênio, e níveis de dióxido de carbono. Por exemplo, biorreatores são tipicamente configuráveis, por exemplo, utilizando orifícios fixados à tubagem, para permitir que componentes gasosos, como oxigênio ou nitrogênio, sejam borbulhados através de uma cultura de líquido. Outros parâmetros de cultura, como o pH do meio de cultura, a identidade e concentração de elementos residuais, e outros constituintes de meios também possam ser mais facilmente manipulados utilizando um biorreator.

[00103] Biorreatores podem ser configurados para fluir meio de cultura através do biorreator durante todo o período de tempo durante o qual as microalgas reproduzem e aumentam em número. Em algumas modalidades, por exemplo, os meios podem ser infundidos no biorreator após inoculação, porém antes das células atingirem uma densidade desejada. Em outros casos, um biorreator é cheio de meio de cultura no início de uma cultura, e nenhuma quantidade adicional de meio de cultura é infundida 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; entretanto, quantidades de meio de cultura aquosa não são fluídas através do biorreator durante todo o período de tempo. Desse modo em algumas modalidades, meio de cultura aquoso não é fluído através do biorreator após inoculação.

[00104] Biorreatores equipados com dispositivos como pás de rotação e impulsores, mecanismos de oscilação, barras de agitação, meio para infusão de gás pressurizado podem ser utilizados para submeter as culturas de microalgas à mistura. A mistura pode ser contínua ou intermitente. Por exemplo, em algumas modalidades, um regime de fluxo turbulento de entrada de gás e entrada de meio não é mantido para reprodução de microalgas até que um aumento desejado em número das microalgas tenha sido obtido.

[00105] Orifícios de biorreator podem ser utilizados para introduzir, ou extrair gases, sólidos, semissólidos e líquidos, na câmara de biorreator contendo as microalgas. Embora muitos biorreatores tenham mais de um orifício (por exemplo, um para entrada de meio, e outro para amostragem), não é necessário que somente uma substância entre ou saia de um orifício. Por exemplo, um orifício pode ser utilizado para fluir meio de cultura para dentro do biorreator e posteriormente utilizado para amostragem, entrada de gás, saída de gás, ou outras finalidades. Preferivelmente, um orifício de amostragem pode ser utilizado repetidamente sem alteração comprometendo a natureza axênica da cultura. Um orifício de amostragem pode ser configurado com uma válvula ou outro dispositivo que permita que o fluxo de amostra seja parado e iniciado ou forneça um meio de amostragem contínua. Biorreatores tem tipicamente pelo menos um orifício que permite inoculação de uma cultura, e tal orifício também pode ser utilizado para outras finalidades como meios ou entrada de gás.

[00106] Orifícios de biorreatores permitem que o teor de gás da cultura de microalgas seja manipulado. Para ilustrar, parte do volume de um

biorreator pode ser gás em vez de líquido, e as entradas de gás do biorreator para permitir bombeamento de gases para dentro do biorreator. Gases que podem ser benéficamente bombeados para dentro de um biorreator incluem ar, misturas de ar/CO<sub>2</sub>, gases nobres, como argônio e outros gases. Biorreatores são tipicamente equipados para permitir que o usuário controle a taxa de entrada de um gás no biorreator. Como observado acima, o fluxo de gás crescente para dentro de um biorreator pode ser utilizado para aumentar a mistura da cultura.

[00107] O fluxo de gás aumentado afeta a turbidez da cultura também. A turbulência pode ser obtida por colocar um orifício de entrada de gás abaixo do nível do meio de cultura aquoso de modo que o gás que entra no biorreator borbulhe até a superfície da cultura. Um ou mais orifícios de saída de gás permitem escapamento de gás, desse modo evitando acúmulo de pressão no biorreator. Preferivelmente um orifício de saída de gás levada a uma válvula “de uma via” que evita que microorganismos contaminantes entrem no biorreator.

### 3. Meios

[00108] Meio de cultura de microalgas contém tipicamente componentes como fonte de nitrogênio fixo, uma fonte de carbono fixo, elementos residuais, opcionalmente um tampão para manutenção de pH, e fosfato (tipicamente fornecido como um sal de fosfato). Outros componentes podem incluir sais como cloreto de sódio, particularmente para microalgas de água do mar. Fontes de nitrogênio incluem fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, incluindo, por exemplo, sem limitação, nitrogênio molecular, nitrato, sais de nitrato, amônia (pura ou em forma de sal, como (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub>OH), proteína, farelo de soja, solução de infusão de milho, e extrato de levedo. Os exemplos de elementos residuais incluem zinco, boro, cobalto, cobre, manganês e molibdênio, por exemplo, nas respectivas formas de ZnCl<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O e

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

[00109] Microorganismos úteis de acordo com os métodos da presente invenção são encontrados em vários locais e ambientes em todo o mundo. Como consequência de seu isolamento de outras espécies e sua divergência evolucionária resultante, o meio de crescimento específico para crescimento ótimo e geração de constituintes de lipídeo e/ou hidrocarboneto podem ser difíceis de prever. Em alguns casos, certas cepas de microorganismos podem ser incapazes de crescer em um meio de crescimento específico devido à presença de algum componente inibidor ou a ausência de alguma exigência nutricional essencial exigida pela cepa de microorganismo específico.

[00110] Meios de crescimento sólidos e líquidos são genericamente disponíveis de uma ampla variedade de fontes, e instruções para a preparação de meios específicos que são apropriados para uma ampla variedade de cepas de microorganismos podem ser encontrados, por exemplo, online em <http://www.utex.org/>, a site mantido pela University of Texas em Austin, 1 University Station A6700, Austin, Texas, 78712-0183, para sua coleção de cultura de algas (UTEX). Por exemplo, vários meios de água salgada e água doce incluem aqueles descritos na Pub. PCT número 2008/151149, incorporado aqui a título de referência.

[00111] Em um exemplo específico, Meio de proteose é apropriado para culturas axênicas, e um volume de 1L do meio (pH ~6,8) pode ser preparado por adição de 1g de peptona de proteose a 1 litro de Meio Bristol. O meio Bristol compreende 2,94 mM  $\text{NaNO}_3$ , 0,17 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,43 mM, 1,29 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , e 1,43 mM  $\text{NaCl}$  em uma solução aquosa. Para 1,5% de meio de Agar, 15 g de Agar podem ser adicionados a 1 L da solução. A solução é coberta e submetida à autoclave, e então armazenada em uma temperatura refrigerada antes do uso. Outro exemplo é o meio de isolamento de *Prototheca* (PIM), que compreende 10g/L de ftalato de hidrogênio de potássio (KHP), 0,9g/L de hidróxido de sódio,



0,1g/L de sulfato de magnésio, 0,2g/L de fosfato de hidrogênio de potássio, 0,3g/L de cloreto de amônio, 10g/L glicose 0,001g/L de cloridreto de tiamina, 20g/L agar, 0,25g/L 5-fluorocitosina, em um pH na faixa de 5,0 a 5,2 (vide Pore, 1973, App. Microbiology, 26: 648-649). Outros meios apropriados para uso com os métodos da invenção podem ser prontamente identificados por consultar o URL identificado acima, ou por consultar outras organizações que mantêm culturas de microorganismos, como SAG, CCAP, ou CCALA. SAG se refere a Culture Collection of Algae na University of Göttingen (Göttingen, Alemanha), CCAP se refere à coleção de culturas de algas e protozoários controlada pela Scottish Association for Marine Science (Escócia, Reino Unido), e CCALA se refere à coleção de cultura de laboratório de algas no Institute of Botany (Třeboň, República Checa). Adicionalmente, a patente US número 5,900,370 descreve formulações de meios e condições apropriadas para fermentação heterotrófica de espécie de *Prototheca*.

[00112] Para produção de óleo, a seleção de uma fonte de carbono fixo é importante, visto que o custo da fonte de carbono fixo deve ser suficientemente baixo para tornar a produção de óleo econômica. Desse modo, embora fontes de carbono apropriadas incluam, por exemplo, acetato, floridoside, frutose, galactose, ácido glucurônico, glicose, glicerol, lactose, manose, N-acetil glicosamina, ramnose, sacarose e/ou xilose, a seleção de insumos contendo aqueles compostos é um aspecto importante dos métodos da invenção. Insumos apropriados úteis de acordo com os métodos da invenção incluem, por exemplo, licor preto, amido de milho, material celulósico despolimerizado, soro de leite, melado, batata, sorgo, sacarose, beterraba, cana de açúcar, arroz e trigo. Fontes de carbono também podem ser fornecidas como uma mistura, como uma mistura de sacarose de polpa de beterraba despolimerizada. Uma ou mais fonte(s) de carbono podem ser fornecidas em uma concentração de pelo menos aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , pelo menos aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , pelo menos aproximadamente 500

$\mu\text{M}$ , pelo menos aproximadamente 5 mM, pelo menos aproximadamente 50 mM e pelo menos aproximadamente 500 mM, de uma ou mais fonte(s) de carbono fixo exogenamente fornecida(s). fontes de carbono de interesse específico para fins da presente invenção incluem celulose (em uma forma despolimerizado), glicerol, sacarose e sorgo, cada um dos quais é discutido em mais detalhes abaixo.

[00113] De acordo com a presente invenção, microorganismos podem ser cultivados inutilizando biomassa celulósica despolimerizada como insumo. Biomassa celulósica (por exemplo, forragem, como forragem de milho) é barata e prontamente disponível; entretanto, as tentativas para utilizar esse material como insumo para levedura falharam. Em particular, verificou-se que tais insumos são inibidores ao crescimento de levedura, e a levedura não pode utilizar os açúcares de 5 carbonos produzidos de materiais celulósicos (por exemplo, xilose de hemicelulose). Por contraste, microalgas podem crescer em material celulósico processado. Materiais celulósicos incluem genericamente aproximadamente 40 a 60% de celulose, aproximadamente 20 a 40% de hemicelulose; e 10 a 30% de lignina.

[00114] Materiais celulósicos apropriados incluem resíduos de culturas de energia de madeira e herbáceas, bem com culturas agrícolas, isto é, as partes de plantas, principalmente talos e folhas, não removidos dos campos com o alimento primário ou produto de fibra. Os exemplos incluem refugos agrícolas como bagaço de cana de açúcar, cascas de arroz, fibra de milho (incluindo talos, folhas, cascas e espigas), palha de trigo, palha de arroz, polpa de beterraba, polpa cítrica, cascas cítricas; refugos de silvicultura como partes finas de madeira dura e madeira macia, e resíduos de madeira dura e madeira macia de operações de madeira; refugos de madeira como refugos de serraria (aparas de madeira, pó de serra) e refugo de descaroçador; refugos urbanos como frações de papel de refugo sólido municipal, refugo de madeira urbano e refugo verde urbano como aparas de grama municipal; e refugo de

construção de madeira. Celulósicos adicionais incluem culturas celulósicas dedicadas como switchgrass, madeira de álamo híbrida, e miscanthus, cana de fibra e sorgo de fibra. Açúcares de cinco carbonos que são produzidos de tais materiais incluem xilose.

[00115] Materiais celulósicos são tratados para aumentar a eficiência com a qual o micróbio pode utilizar o(s) açúcar(es) contido(s) nos materiais. A invenção provê métodos novos para o tratamento de materiais celulósicos após explosão ácida de modo que os materiais sejam apropriados para uso em uma cultura heterotrófica de micróbios (por exemplo, microalgas e levedura oleaginosa). Como discutido acima, biomassa lignocelulósica é compreendida de varias frações, incluindo celulose, um polímero cristalino de glicose ligado 1,4 beta (um açúcar de seis carbonos, hemicelulose, um polímero mais frouxamente associado predominantemente compreendido de xilose (um açúcar de cinco carbonos) e até um ponto menor manose, galactose, arabinose, lignina, um polímero aromático complexo compreendido de álcool de sinapila e seus derivados, e pectinas, que são cadeias lineares de um ácido poligalacturônico ligado 1,4 alfa. Devido à estrutura polimérica de celulose e hemicelulose, os açúcares (por exemplo, xilose e glicose monomérica) nos mesmos não estão em uma forma que possa ser eficientemente utilizada (metabolizada) por muitos micróbios. Para tais micróbios, o processamento adicional da biomassa celulósica para gerar os açúcares monoméricos que compõem os polímeros podem ser muito úteis para assegurar que os materiais celulósicos sejam eficientemente utilizados como insumo (fonte de carbono).

[00116] Celulose ou biomassa celulósica é submetida a um processo, denominado “explosão”, no qual a biomassa é tratada com ácido sulfúrico (ou outro) diluído em temperatura e pressão elevadas. Esse processo condiciona a biomassa de tal modo que possa ser eficientemente submetida à hidrólise enzimática das frações celulósica e hemicelulósica em monômeros de xilose e glicose. Os açúcares monoméricos resultantes são denominados açúcares

celulósicos. Açúcares celulósicos podem ser subsequenteiramente utilizados por microorganismos para produzir uma variedade de metabolitos (por exemplo, lipídeo). A etapa de explosão de ácido resulta em uma hidrólise parcial da fração de hemicelulose em monossacarídeos constituintes. Esses açúcares podem ser totalmente liberados da biomassa com tratamento adicional. Em algumas modalidades, o tratamento adicional é um tratamento hidrotérmico que inclui lavagem do material explodido com água quente, que remove contaminantes como sais. Essa etapa não é necessária para fermentações de etanol celulósico devido às concentrações mais diluídas de açúcar utilizadas em tais processos. Em outras modalidades, o tratamento adicional é tratamento ácido adicional. Ainda em outras modalidades, o tratamento adicional é hidrólise enzimática do material explodido. Esses tratamentos também podem ser utilizados em qualquer combinação. O tipo de tratamento pode afetar o tipo de açúcares liberados (por exemplo, açúcares de cinco carbonos versus açúcares de seis carbonos) e o estágio no qual são liberados no processo. Como consequência fluxos diferentes de açúcar, quer sejam predominantemente de cinco carbonos ou de seis carbonos, podem ser criados. Esses fluxos de cinco carbonos ou seis carbonos enriquecidos podem ser desse modo dirigidos a microorganismos específicos com capacidades de utilização de carbono diferentes.

[00117] Os métodos da presente invenção envolvem tipicamente a fermentação em densidades de célula mais elevadas do que o que é obtido em fermentação de etanol. Devido às densidades mais elevadas das culturas para produção de óleo celulósico heterotrófico, a fonte de carbono fixa (por exemplo, o(s) fluxo(s) de açúcar derivado celulósico) está preferivelmente em uma forma concentrada. O nível de glicose do material celulósico despolimerizado é preferivelmente pelo menos 300 g/litro, pelo menos 400g/litro, pelo menos 500 g/litro ou pelo menos 600 g/litro antes da etapa de cultivo, que é opcionalmente um cultivo de batelada alimentada no qual o

material é alimentado para as células com o passar do tempo à medida que as células crescem e acumulam lipídeo. Fluxos de açúcar celulósico não são utilizados em ou próximo a essa faixa de concentração na produção de etanol celulósico. Desse modo, para gerar e manter as densidades de células muito elevadas durante a produção de óleo lignocelulósico, o (s) insumo(s) de carbono deve(m) ser distribuído(s) nas culturas heterotróficas em uma forma altamente concentrada. Entretanto, qualquer componente no fluxo de alimentação que não seja um substrato para, e não seja metabolizado pelo microorganismo oleaginoso acumulará no biorreator, o que pode levar a problemas se o competente for tóxico ou inibidor para a produção do produto final desejado. Embora lignina e subprodutos derivados de lignina, subprodutos derivados de carboidrato como furfurais e hidroximetil furfurais e sais derivados da geração dos materiais celulósicos (tanto no processo de explosão como no processo de neutralização subsequente) e mesmo açúcares de hexose/pnose não metabolizados podem apresentar problemas em fermentações etanólicas, esses efeitos são amplificados significativamente em um processo no qual sua concentração no insumo inicial é elevada. Para obter concentrações de açúcar na faixa de 300 g/L (ou mais elevada para açúcares de seis carbonos que podem ser utilizadas em produção em grande escala de óleo lignocelulósico descrito na presente invenção, a concentração desses materiais tóxicos pode ser 20 vezes mais elevada do que as concentrações tipicamente presentes em fermentações etanólicas de biomassa celulósica.

[00118] O tratamento de processo de explosão do material celulósico utiliza quantidades significativas de ácido sulfúrico, calor e pressão, desse modo liberando subprodutos de carboidratos, a saber furfurais e hidroximetil furfurais. Furfurais e hidroximetil furfurais são produzidos durante hidrólise de hemicelulose através da desidratação de xilose em furfural e água. Em algumas modalidades da presente invenção, esses subprodutos (por exemplo, furfurais e hidroximetil furfurais) são removidos do material lignocelulósico

sacarificado antes da introdução no biorreator. Em certas modalidades da presente invenção, o processo para remoção dos subprodutos de carboidratos é tratamento hidrotérmico dos materiais celulósicos explodidos. Além disso, a presente invenção provê métodos nos quais as cepas capazes de tolerar compostos como furfurais ou hidroximetil furfurais são utilizadas para produção de óleo lignocelulósico. Em outra modalidade, a presente invenção também provê métodos e microorganismos que não são somente capazes de tolerar furfurais no meio de fermentação, como são na realidade capazes de metabolizar esses subprodutos durante a produção de óleo lignocelulósico.

[00119] O processo de explosão também gera níveis significativos de sais. Por exemplo, condições típicas para explosão podem resultar em condutividades em excesso de 5 mS/cm quando a biomassa celulósica explodida é ressuspensa em uma razão de 10:1 água:sólidos (peso seco). Em certas modalidades da presente invenção, a biomassa explodida diluída é submetida à sacarificação enzimática, e o sobrenadante resultante é concentrado até 25 vezes para uso no biorreator. O nível de sal (como medido por condutividade) no(s) fluxo(s) de açúcar concentrado pode ser inaceitavelmente elevado (até 1,5 M Na<sup>+</sup> equivalentes). Sais adicionais são gerados após neutralização dos materiais explodidos para o processo de sacarificação enzimática subsequente também. A presente invenção provê métodos para remover esses sais de modo que o(s) fluxo(s) de açúcar celulósico concentrado(s) resultante(s) pode(m) ser utilizados em processos heterotróficos para produzir óleo lignocelulósico. Em algumas modalidades, o método de remover esses sais é deionização com resinas, como, porém não limitados a DOWEX Marathon MR3, Em certas modalidades, a etapa de deionização com resina ocorre antes da concentração de açúcar ou ajuste de pH e tratamento hidrotérmico de biomassa antes da sacarificação, ou qualquer combinação do anterior; em outras modalidades, a etapa é conduzida após um ou mais desses processos. Em outras modalidades, o próprio processo de

explosão é alterado de modo a evitar a geração de sais em níveis inaceitavelmente elevados. Por exemplo, uma alternativa apropriada para explosão de ácido sulfúrico (ou outro ácido) da biomassa celulósica é polpagem mecânica para tornar a biomassa celulósica respectiva à hidrólise enzimática (sacarificação). Ainda em outras modalidades, cepas nativas de microorganismos resistentes a níveis elevados de sais ou cepas geneticamente construídas com resistência a níveis elevados de sais são utilizados.

[00120] Uma modalidade preferida para o processo de preparação de biomassa celulósica explodida para uso em produção de óleo lignocelulósico heterotrófico utilizando micróbios oleaginosos é diagramada na figura 10, Etapa I compreende ajuste do pH da biomassa celulósica explodida ressuspensa até a faixa de 5,0 a 5,3 seguido por lavagem da biomassa celulósica três vezes. Essa etapa de lavagem pode ser realizada por uma variedade de meios incluindo o uso de resinas de permuta de íon e dessalinização, osmose inversa, tratamento hidrotérmico (como descrito acima), ou apenas ressuspensão repetida e centrifugação em água deionizada. Essa etapa de lavagem resulta em um fluxo celulósico cuja condutividade está entre 100 a 300 uS/cm e a remoção de quantidades significativas de furfurais e hidroximetil furfurais. Decantações dessa etapa de lavagem podem ser economizados para concentrar açúcares de cinco carbonos liberados da fração de hemicelulose. A etapa II compreende sacarificação enzimática da biomassa celulósica lavada. Em uma modalidade preferida, Accellerase (Genencor) é utilizado. A etapa III compreende a recuperação de açúcares através de centrifugação ou decantação e enxágue da biomassa sacarificada. A biomassa resultante (sólidos) é um componente rico em lignina, denso em energia que pode ser utilizado como combustível ou enviado para refugo. O fluxo de açúcar recuperado no processo de centrifugação/decantação e enxágue é coletado. A etapa IV compreende microfiltração para remover sólidos contaminantes com a recuperação do permeado. A etapa V compreende uma

etapa de concentração que pode ser realizada utilizando um evaporador a vácuo. Essa etapa pode incluir opcionalmente a adição de agentes antiespuma como P'2000 (Sigma/Fluka) que é às vezes necessário devido ao teor de proteína do insumo de açúcar resultante.

[00121] Em outra modalidade do método da invenção, a fonte de carbono é glicerol, incluindo subproduto de glicerol acidulado e não acidulado de transesterificação de biodiesel. Em uma modalidade, a fonte de carbono inclui glicerol e pelo menos outra fonte de carbono. Em alguns casos, todo glicerol e pelo menos outra fonte de carbono fixo são fornecidos para o microorganismo no início da fermentação. Em alguns casos, o glicerol e pelo menos outra fonte de carbono fixo são fornecidos ao microorganismo simultaneamente em uma razão predeterminada. Em alguns casos, o glicerol e pelo menos outra fonte de carbono fixo são alimentadas para os micróbios em uma taxa predeterminada durante o curso de fermentação.

[00122] Algumas microalgas são submetidas à divisão de células mais rapidamente na presença de glicerol do que na presença de glicose (vide a publicação PCT número 2008/151149). Nesses casos, processos de crescimento em dois estágios nos quais são primeiramente alimentadas com glicerol para rapidamente aumentar a densidade das células, e são, então, alimentadas com glicose para acumular lipídeos podem melhorar a eficiência com a qual os lipídeos são produzidos. O uso do subproduto de glicerol do processo de transesterificação provê vantagens econômicas significativas quando colocado de volta no processo de produção. Outros métodos de alimentação são fornecidos também, como misturas de glicerol e glicose. A alimentação de tais misturas também captura os mesmos benefícios econômicos. Além disso, a invenção provê métodos de alimentar açúcares alternativos para microalgas como sacarose em várias combinações com glicerol.

[00123] Em outra modalidade dos métodos da invenção, a fonte de



carbono é sacarose, incluindo um insumo complexo contendo sacarose, como suco de cana grosso de processamento de cana de açúcar. Em uma modalidade, o meio de cultura inclui ainda pelo menos uma enzima de utilização de sacarose. Em alguns casos, o meio de cultura inclui uma invertase de sacarose. Em uma modalidade, a enzima de invertase de sacarose é uma enzima de invertase de sacarose secretável codificada por um gene de invertase de sacarose exógena expresso pela população de microorganismos. Desse modo, em alguns casos, como descrito em mais detalhes na Seção IV, abaixo, as microalgas foram geneticamente construídas para expressar uma enzima de utilização de sacarose, como um transportador de sacarose, uma invertase de sacarose, uma hexocinase, uma glucocinase, ou uma frutocinase.

[00124] Insumos complexos contendo sacarose incluem melado de refugo do processamento de cana de açúcar; o uso desse produto de refugo de baixo valor, do processamento de cana de açúcar, pode fornecer economia de custo significativa na produção de hidrocarbonetos e outros óleos. Outro insumo complexo que contém sacarose que é útil nos métodos da invenção é sorgo, incluindo xarope de sorgo e sorgo puro. Xarope de sorgo é produzido do suco de cana de sorgo doce. Seu perfil de açúcar consiste principalmente em glicose (dextrano), frutose e sacarose.

#### **4. Produção de óleo**

[00125] Para a produção de óleo de acordo com os métodos da invenção, é preferível cultivar células no escuro, como é o caso, por exemplo, ao utilizar fermentadores extremamente grandes (40,000 litros e superior) que não permitem que a luz atinja a cultura. Espécies de *Prototheca* são crescidas e propagadas para a produção de óleo em um meio contendo uma fonte de carbono fixo e na ausência de luz; tal crescimento é conhecido como crescimento heterotrófico.

[00126] Como exemplo, um inóculo de células de microalgas que produzem lipídeo é introduzido no meio; há um período de retardo (fase de

retardo) antes das células começarem a se propagar. Após o período de retardo, a taxa de propagação aumenta constantemente e entra fase de log, ou exponencial. A fase exponencial é, por sua vez, seguida por diminuição de propagação devido a diminuições em nutrientes como nitrogênio, aumentos em substâncias tóxicas, e mecanismos de sentir quorum. Após essa diminuição, a propagação para, e as células entram em uma fase estacionária ou estado de crescimento constante, dependendo do ambiente específico fornecido às células. Para obter biomassa rica em lipídeo, a cultura é tipicamente colhida bem após o término da fase exponencial, que pode ser terminada cedo por permitir que nitrogênio ou outro nutriente chave (diferente de carbono) se torne esgotado, forçando as células a converterem as fontes de carbono, presentes em excesso, em lipídeo. Parâmetros de condição de cultura podem ser manipulados para otimizar produção total de óleo, a combinação de espécies de lipídeos produzida, e/ou produção de um óleo específico.

[00127] Como discutido acima, um biorreator ou fermentador é utilizado para permitir que células sejam submetidas a várias fases de seu ciclo de crescimento. Como exemplo, um inoculo de células que produzem lipídeo pode ser introduzido em um meio seguido por um período de retardo (fase de retardo) antes das células começarem o crescimento. Após o período de retardo, a taxa de crescimento aumenta constantemente e entra na fase log ou exponencial. A fase exponencial é por sua vez seguida por diminuição de crescimento devido a diminuições em nutrientes e/ou aumentos em substâncias tóxicas. Após essa diminuição, o crescimento para, e as células entram em uma fase estacionária ou estado constante, dependendo do ambiente específico fornecido às células. A produção de lipídeo por células reveladas aqui pode ocorrer durante a fase log ou posteriormente, incluindo a fase estacionária em que nutrientes são fornecidos, ou ainda disponíveis, para permitir a continuação de produção de lipídeos na ausência de divisão de células.

[00128] Preferivelmente, microorganismos crescidos utilizando condições descritas aqui e conhecidos na técnica compreendem pelo menos aproximadamente 20% em peso de lipídeo, preferivelmente pelo menos aproximadamente 40% em peso, mais preferivelmente pelo menos aproximadamente 50% em peso, e mais preferivelmente pelo menos aproximadamente 60% em peso. Condições de processo podem ser ajustadas para aumentar o rendimento de lipídeos apropriados para um uso específico e/ou reduzir custo de produção. Por exemplo, em certas modalidades, uma microalga é cultivada na presença de uma concentração de limite de um ou mais nutrientes, como, por exemplo, nitrogênio, fósforo, ou enxofre, enquanto fornece um excesso de energia de carbono fixa como glicose. A limitação de nitrogênio tende a aumentar o rendimento microbiano de lipídeo em relação ao rendimento microbiano de lipídeo em uma cultura na qual nitrogênio é fornecido em excesso. Em modalidades específicas, o aumento em rendimento de lipídeo é pelo menos aproximadamente: 10%, 50%, 100%, 200% ou 500%. O micróbio pode ser cultivado na presença de uma quantidade limitação de um nutriente para uma porção do período total de cultura ou para o período inteiro. Em modalidades específicas, a concentração de nutriente é ciclada entre uma concentração de limitação e uma concentração não de limitação pelo menos duas vezes durante o período tal de cultura. O teor de lipídeo de células pode ser aumentado por continuar a cultura por períodos aumentados de tempo enquanto fornece um excesso de carbono, porém limitando ou sem nitrogênio.

[00129] Em outra modalidade, o rendimento de lipídeo é aumentado por cultivar um micróbio que produz lipídeo (por exemplo, microalgas) na presença de um ou mais cofator(es) para uma enzima de via de lipídeo (por exemplo, uma enzima sintética de ácido graxo). Genericamente, a concentração do(s) cofator(es) é suficiente para aumentar rendimento de lipídeo microbiano (por exemplo, ácido graxo) em relação ao rendimento de

lipídeo microbiano na ausência do(s) cofator(es). Em uma modalidade específica, o(s) cofator(es) são fornecidos à cultura por incluir na cultura um micróbio (por exemplo, microalgas) contendo um gene exógeno que codifica o(s) cofator(es). Alternativamente, cofator(es) podem ser fornecidos a uma cultura por incluir um micróbio (por exemplo, microalgas) contendo um gene exógeno que codifica uma proteína que participa na síntese do cofator. Em certas modalidades, cofatores apropriados incluem qualquer vitamina exigida por uma enzima de via de lipídeo, como, por exemplo: biotina, pantotenato. Genes que codificam cofatores apropriados para uso na invenção ou que participam na síntese de tais cofatores são bem conhecidos e podem ser introduzidos em micróbios (por exemplo, microalgas) utilizando construtos e técnicas como aquelas descritas acima.

[00130] Os exemplos específicos de biorreatores, condições de cultura, e métodos de crescimento e propagação heterotróficos descritos aqui podem ser combinados em qualquer modo apropriado para melhorar a eficiência de crescimento microbiano e produção de lipídeo e/ou proteína.

[00131] Biomassa de microalgas com elevada percentagem de acúmulo de lipídeo/óleo por peso seco foi gerada utilizando métodos de cultura diferentes, que são conhecidos na técnica (vide a publicação PCT número 2008/151149). Biomassa de microalgas gerada pelos métodos de cultura descritos aqui e úteis de acordo com a presente invenção compreende pelo menos 10% de óleo de microalga em peso seco. Em algumas modalidades, a biomassa de microalga compreende pelo menos 25% , pelo menos 50%, pelo menos 55%, ou pelo menos 60% de óleo de microalga em peso seco. Em algumas modalidades, a biomassa de microalga contém de 10 a 90% de óleo de microalga, de 25 a 75% de óleo de microalga, de 40 a 75% de óleo de microalga, ou de 50 a 70% de óleo de microalga por peso seco.

[00132] O óleo de microalga da biomassa descrito acima, ou extraído da biomassa para uso nos métodos e composições da presente invenção pode

compreender glicerolipídeos com uma ou mais cadeias laterais de éster de ácido graxo distintas. Glicerolipídeos compreendem uma molécula de glicerol esterificada a uma, duas ou três moléculas de ácido graxo, que podem ser de comprimentos variáveis e ter graus de saturação variáveis. As características de comprimento e saturação das moléculas de ácido graxo (e os óleos de microalgas) podem ser manipuladas para modificar as propriedades ou proporções das moléculas de ácido graxo nos óleos de microalgas da presente invenção através de condições de cultura ou através de engenharia de via de lipídeo, como descrito em mais detalhe na seção IV, abaixo. Desse modo, misturas específicas de óleo de algas podem ser preparadas em uma espécie única de algas por misturar juntas a biomassa ou óleo de alga de duas ou mais espécies de microalgas, ou por misturar óleo de alga da invenção com óleos de outras fontes, como soja, semente de colza, canola, palma, semente de palma, coco, milho, refugo de vegetal, sebo chinês, azeitona, girassol, semente de algodão, gordura de galinha, sebo de boi, sebo de porco, microalgas, macroalgas, *Cuphea*, linho, amendoim, graxa branca de escolha, banha, *Camelina sativa*, semente de mostarda, castanha de caju, aveias, tremoço, kenaf, calendula, cânhamo, café, linhaça (linho), avelã, euforbia, semente de abobora, pecan, jojoba, jatrpfa, macadamia, castanhas do Pará, abacate, petróleo, ou uma fração destilada de quaisquer dos óleos anteriores.

[00133] A composição de óleo, isto é, as propriedades e proporções dos constituintes de ácido graxo dos glicerolipídeos, também pode ser manipulada por combinar biomassa ou óleo de pelo menos duas espécies distintas de microalgas. Em algumas modalidades, pelo menos duas das espécies distintas de microalgas têm perfis de glicerolipídeos diferentes. As espécies distintas de microalgas podem ser cultivadas juntas ou separadamente como descrito acima, preferivelmente sob condições heterotróficas, para gerar os respectivos óleos. Espécies diferentes de microalgas podem conter percentagens diferentes de constituintes de ácido

graxo distintos nos glicerolipídeos de célula.

[00134] Genericamente, cepas de *Prototheca* têm muito pouco ou nenhum ácido graxo com o comprimento de cadeia C8-C14, Por exemplo, *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), *Prototheca krugani* (UTEX 329), *Prototheca stagnora* (UTEX 1442) e *Prototheca zopfii* (UTEX 1438) não contém (ou contém quantidades não detectáveis) de ácidos graxos C8, entre 0 a 0,01% de ácidos graxos C10, entre 0,03 a 2,1% de ácidos graxos C12 e entre 1,0 a 1,7% de ácidos graxos C14.

[00135] Em alguns casos, as cepas de *Prototheca* contendo um transgene que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa que tem atividade para substrato ACP-acila graxa de comprimentos de cadeia C8-C10 tem pelo menos 0,3%, pelo menos 0,8%, pelo menos 1,5% ou mais de ácidos graxos de comprimento de cadeia C8 e pelo menos 0,3%, pelo menos 1,0%, pelo menos 3,0%, pelo menos 5% ou mais de ácidos graxos de comprimento de cadeia C10, Em outros casos, as cepas *Prototheca* contendo um transgene que codifica um tioesterase ACP-acila graxa que tem atividade em direção ao substrato ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C12 tem pelo menos 3,0%, pelo menos 5%, pelo menos 7%, pelo menos 10%, pelo menos 13% ou mais de ácidos graxos do comprimento de cadeia C12 e pelo menos 1,5%, pelo menos 2% ou pelo menos 3% ou mais de ácidos graxos do comprimento de cadeia C14, Em outros casos, as cepas de *Prototheca* contendo um transgene que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa que tem atividade para substrato ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C14 tem pelo menos 4,0%, pelo menos 7%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25% ou mais ácidos graxos do comprimento de cadeia C14, e pelo menos 0,4%, pelo menos 1%, pelo menos 1,5% ou mais de ácidos graxos do comprimento de cadeia C12.

[00136] Em exemplos não limitadores, as cepas de *Prototheca* contendo um transgene que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa que tem

atividade para o substrato ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C8 e C10 tem entre 0,3 a 1,58% de ácidos graxos de comprimento de cadeia C8 e entre 0,35 a 6,76% de ácidos graxos do comprimento de cadeia C10. Em outros exemplos não limitadores, as cepas de *Prototheca* contendo um transgene que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa que tem atividade para o substrato ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C12 tem entre 3,9 a 14,11% de ácidos graxos do comprimento de cadeia C12 e entre 1,95 a 3,05% de ácidos graxos do comprimento de cadeia C14. Em outros exemplos não limitadores, cepas de *Prototheca* contendo um transgene que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa que tem atividade para o substrato ACP-acila graxa de comprimento de cadeia C14 tem entre 4,40 a 17,35% de ácidos graxos do comprimento de cadeia C14 e entre 0,4 a 1,83% de área de ácidos graxos do comprimento de cadeia C12. Em alguns casos, as cepas de *Prototheca* contendo um transgene que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa que tem atividade para o substrato ACP-acila graxa de comprimentos de cadeia entre C8 e C14 têm entre 3,5 a 20% ácidos graxos de cadeia média (C8-C14). Em alguns casos, manter as cepas de *Prototheca* transgênicas sob pressão seletiva elevada e constante para reter genes exógenos é vantajoso devido ao aumento no ácido graxo desejado de um comprimento de cadeia específico. Em um exemplo não limitador, o exemplo 5 demonstra um aumento de duas vezes em ácidos graxos de comprimento de cadeia C14 (maior do que 30% de ácidos graxos de comprimento de cadeia C8-C14) quando a cultura de *Prototheca moriformis* contendo um gene exógeno de tioesterase preferido C14 é retido. Níveis elevados de retenção de gene exógeno também podem ser obtidos por inserir genes exógenos nos cromossomos nucleares das células utilizando vetores de recombinação homólogos e métodos revelados aqui. Células recombinantes contendo genes exógenos integrados em cromossomos nucleares são um objeto da invenção.

[00137] Óleo de microalga também inclui outros constituintes

produzidos pelas microalgas, ou incorporados no óleo de microalgas a partir do meio de cultura. Esses outros constituintes podem estar presentes em quantidade variável dependendo das condições de cultura utilizadas para cultivar as microalgas, a espécie de microalgas, o método de extração utilizado para recuperar óleo de microalgas a partir da biomassa e outros fatores que podem afetar a composição de óleo de microalga. Exemplos não limitadores de tais constituintes incluem carotenóides, presentes de 0,1 a 0,4 microgramas/ml, clorofila presente de 0 a 0,02 miligrama/quilograma de óleo, gama tocoferol presente de 0,4 a 0,6 miligrama/100 gramas de óleo, e tocotrienóis totais presentes de 0,2 a 0,5 miligramas/gramas de óleo.

[00138] Os outros constituintes podem incluir, sem limitação, fosfolípidios, tocoferóis, tocotrienóis, carotenóides (por exemplo, alfa-caroteno, beta-caroteno, licopeno, etc.), xantofilas (por exemplo, luteína, zeaxantina, alfa-criptoxantina e beta-criptoxantina) e vários compostos orgânicos ou inorgânicos.

[00139] Em alguns casos, o óleo extraído da espécie *Prototheca* compreende não mais do que 0,02 mg/kg de clorofila. Em alguns casos, o óleo extraído da espécie *Prototheca* compreende não mais do que 0,4 mg/ml carotenóides totais. Em alguns casos o óleo de *Prototheca* compreende entre 0,40 a 0,60 miligrama de gama tocoferol por 100 gramas de óleo. Em outros casos, o óleo de *Prototheca* compreende entre 0,2 a 0,5 miligrama de tocotrienóis totais por grama de óleo.

### **III. MÉTODOS E MATERIAIS DE ENGENHARIA GENÉTICA**

[00140] A presente invenção provê métodos e materiais para modificar geneticamente células de *Prototheca* e células hospedeiras recombinantes úteis nos métodos da presente invenção, incluindo, porém, não limitados a células hospedeiras *Prototheca moriformis*, *Prototheca zopfii*, *Prototheca krugani* e *Prototheca stagnora* recombinantes. A descrição desses métodos e



materiais é dividida em subseções para conveniência do leitor. Na subseção 1, métodos de transformação são descritos. Na subseção 2, métodos de engenharia genética utilizando recombinação homóloga são descritos. Na subseção 3, vetores de expressão e componentes são descritos.

### 1. Métodos de Engenharia – Transformação

[00141] Células podem ser transformadas por qualquer técnica apropriada incluindo, por exemplo, biolística, eletroporação (vide Maruyama e outros. (2004), *Biotechnology Techniques* 8:821 a 826), transformação de conta de vidro e transformação de whisker de carbeto de silício. Outro método que pode ser utilizado envolve a formação de protoplastos e uso de  $\text{CaCl}_2$  e polietileno glicol (PEG) para introduzir DNA recombinante em células de microalgas (vide Kim e outros. (2002), *Mar. Biotechnol.* 4:63-73, que relata o uso desse método para a transformação de *Chorella ellipsoidea*). A cotransformação de microalgas pode ser utilizada para introduzir duas moléculas de vetor distintas em uma célula simultaneamente (vide, por exemplo, *Protist* 2004 Dez;155(4):381-93).

[00142] Métodos biolísticos (vide, por exemplo, Sanford, *Trends In Biotech.* (1988) 6:299 302, patente US número 4,945,050; eletroporação (Fromm e outros., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* (1985) 82:5824 5828); uso de um feixe laser, microinjeção ou qualquer outro método capaz de introduzir DNA em uma microalga também podem ser utilizados para transformação de uma célula de *Prototheca*.

### [00143] 2. Métodos de Engenharia – Recombinação Homóloga

[00144] Recombinação homóloga é a capacidade de sequências de DNA complementares alinharem e permutarem regiões de homologia. DNA transgênico (“doador”) contendo sequências homólogas às sequências genômicas alvo (“gabarito”) é introduzido no organismo e então submetido à recombinação no genoma no sítio das sequências homólogas genômicas

correspondentes. As etapas mecânicas desse processo, na maioria dos casos, incluem: (1) emparelhamento de segmentos de DNA homólogos; (2) introdução de quebras de fita dupla na molécula de DNA doador; (3) invasão da molécula de DNA gabarito pelas extremidades de DNA doador livre seguido por síntese de DNA; e (4) resolução de eventos de reparo de quebra de fita dupla que resulta em produtos de recombinação final.

[00145] A capacidade de realizar recombinação homóloga em um organismo hospedeiro tem muitas implicações práticas para o que pode ser realizado no nível genético molecular e é útil na geração de um micróbio oleaginoso que pode produzir óleos moldados. Por sua natureza, recombinação homóloga é um evento preciso de “mirar” um gene, conseqüentemente a maioria das linhas transgênicas geradas com a mesma sequência alvo serão essencialmente idênticas em termos de fenótipo, necessitando da seleção de bem menos eventos de transformação. A recombinação homóloga também objetiva eventos de inserção de gene no cromossomo hospedeiro, resultando em excelente estabilidade genética, mesmo na ausência de seleção genética. Como locais cromossômicos diferentes impactarão provavelmente a expressão de gene, mesmo de promotores heterólogos/UTRs, a recombinação homóloga pode ser um método de consultar locais em um ambiente de genoma não familiar e avaliar o impacto desses ambientes sobre a expressão de gene.

[00146] Aplicações de engenharia genética particularmente úteis utilizando recombinação homóloga são elementos reguladores hospedeiros específicos como promotores/UTRs para acionar expressão de gene heterólogo em um modo altamente específico. Por exemplo, a ablação precisa do gene desaturase ACP de estearoíla endógeno com um cassete de gene (tioesterase) FATB específico C12:0 heterólogo e marcador seletivo apropriado, poderia ser esperada diminuir dramaticamente níveis endógenos de ácidos graxos C18:1 concomitante com níveis aumentados dos ácidos

graxos C12:0, O exemplo 13 descreve o construto para recombinação homóloga que é apropriado para a ablação de um gene desaturase ACP estearoíla de *Prototheca moriformis* endógeno.

[00147] Como a recombinação homóloga é um evento de “mirar” gene de modo preciso, pode ser utilizado para modificar precisamente quaisquer nucleotídeo(s) em um gene ou região de interesse, desde que regiões de flanquear suficientes tenham sido identificadas. Portanto, a recombinação homóloga pode ser utilizada como meio para modificar sequências reguladoras que impactam expressão de gene de RNA e/ou proteínas. Também pode ser utilizado para modificar regiões de codificar proteína em um esforço para modificar atividades de enzima como especificidade de substrato, afinidades e  $K_m$ , e desse modo afetando a alteração desejada em metabolismo da célula hospedeira. Recombinação homóloga provê um meio potente para manipular o genoma hospedeiro resultando em “gene targeting”, conversão de gene, deleção de gene, duplicação de gene, inversão de gene e permutar elementos reguladores de expressão de gene como promotores, intensificadores e 3’UTRs.

[00148] Recombinação homóloga pode ser obtida utilizando construtos de contendo pedaços de sequências endógenas para “mirar” o gene ou região de interesse no genoma de célula hospedeira endógeno. Tais sequências para “mirar” podem ser localizadas 5’ do gene ou região de interesse, 3’ do gene/região de interesse ou mesmo flanquear o gene/região de interesse. Tais construtos para “mirar” podem ser transformados na célula hospedeira como um DNA de plasmídeo super-enrolado com espinha dorsal de vetor adicional, um produto PCR sem espinha dorsal de vetor, ou como uma molécula linearizada. Em alguns casos, pode ser vantajoso primeiramente expor as sequências homólogas no DNA transgênico (DNA doador) com uma enzima de restrição. Essa etapa pode aumentar a eficiência de recombinação e diminuir a ocorrência de eventos indesejáveis. Outros métodos de aumentar a

eficiência de recombinação incluem o uso de PCR para gerar DNA transgênico de transformação que contém extremidades lineares homólogas às sequências genômicas alvo.

### **3. Vetores e componentes de vetor**

[00149] Vetores para transformação de microorganismos de acordo com a presente invenção podem ser preparados por técnicas conhecidas familiares para aqueles versados na técnica em vista da revelação da presente invenção. Um vetor contém tipicamente um ou mais genes, nos quais cada gene codifica a expressão de um produto desejado (o produtor de gene) e é operativamente ligado a uma ou mais sequências de controle que regulam a expressão de gene ou direcionam o produto de gene a um local específico na célula recombinante. Para auxiliar o leitor, essa subseção é dividida em subseções. A subseção A descreve sequências de controle tipicamente contidas em vetores bem como sequências de controle novas fornecidas pela presente invenção. A subseção B descreve genes contidos tipicamente em vetores bem como métodos de otimização de códon novos e genes preparados utilizando os mesmos fornecidos pela invenção.

#### **A. Sequências de controle**

[00150] Sequências de controle são ácidos nucleicos que regulam a expressão de uma sequência de codificação ou orientam um produto de gene a um local específico em ou fora de uma célula. Sequências de controle que regulam expressão incluem, por exemplo, promotores que regulam a transcrição de uma sequência de codificação e terminadores que terminam transcrição de uma sequência de codificação. Outra sequência de controle é uma sequência não traduzida 3' localizada na extremidade de uma sequência de codificação que codifica um sinal de poliadenilação. Sequências de controle que orientam produtos de gene para locais específicos incluem aquelas que codificam peptídeos de sinais, que orientam a proteína à qual são fixados a um local específico em ou fora da célula.

[00151] Desse modo, um desenho de vetor exemplar para expressão de um gene exógeno em uma microalga contém uma sequência de codificação para um produto de gene desejado (por exemplo, um marcador selecionável, uma enzima de modificação de via de lipídeo, ou uma enzima de utilização de sacarose) em ligação operável com um promotor ativo em microalgas. Alternativamente, se o vetor não contiver um promotor em ligação operável com a sequência de codificação de interesse, a sequência de codificação pode ser transformada nas células de tal modo que se torne operativamente ligada a um promotor endógeno no ponto de integração de vetor. O método de transformação sem promotor provou funcionar em microalgas (vide, por exemplo, Plant Journal 14:4 (1998), pág. 441 a 447).

[00152] Muitos promotores são ativos em microalgas, incluindo promotores que são endógenos para as algas sendo transformadas, bem como promotores que não são endógenos para as algas sendo transformadas (isto é, promotores de outras algas, promotores de plantas mais elevadas, e promotores de vírus de planta ou vírus de algas). Promotores exógenos e/ou endógenos ilustrativos que são ativos em microalgas (bem com genes de resistência a antibiótico funcionais em microalgas) são descritos na pub. PCT no. 2008/151149 e referências citadas na mesma.

[00153] O promotor utilizado para expressar um gene exógeno pode ser o promotor ligado naturalmente aquele gene ou pode ser um gene heterólogo. Alguns promotores são ativos em mais de uma espécie de microalgas. Outros promotores são específicos de espécie. Promotores ilustrativos incluem promotores como  $\beta$ -tubulina de *Chlamydomonas reinhardtii*, utilizado nos Exemplos abaixo e promotores virais, como vírus mosaico de couve-flor (CMV) e vírus clorela, que mostraram ser ativos em múltiplas espécies de microalgas (vide, por exemplo, Plant Cell Rep. 2005 Mar;23(10-11):727-35; J Microbiol. 2005 agosto; 43(4):361-5; Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan;4(1):63-73). Outro promotor que é adequado para

uso para expressão de gene exógenos em *Prototheca* é o promotor de desidrogenase glutamato *Chlorella sorokiniana*/5' UTR (SEQ ID NO: 69). Opcionalmente, pelo menos 10, 20, 30, 40, 50 ou 60 nucleotídeos ou mais dessas sequências contendo um promotor são utilizados. Promotores ilustrativos úteis para expressão de genes exógenos em *Prototheca* são listados na listagem de sequências desse pedido, como promotor do gene HUPI *Chlorella* (SEQ ID NO: 1) e o promotor reductase nitrato *Chlorella ellipsoidea* (SEQ ID NO: 2). Promotores de vírus *Chlorella* também podem ser utilizados para expressar genes em *Prototheca*, como SEQ ID NOS: 1-7 da patente US 6,395,965. Promotores adicionais ativos em *Prototheca* podem ser encontrados, por exemplo, em Biochem Biophys Res Commun. 1994 Out 14;204(1):187-94; Plant Mol Biol. 1994 Out;26(1):85-93; Virology. 2004 Agosto 15;326(1):150-9; e Virology. 2004 Jan 5;318(1):214-23.

[00154] Um promoter pode ser genericamente caracterizado como constitutivo ou induzível. Promotores constitutivos são genericamente ativos ou funcionam para acionar expressão durante todo o tempo (ou em certos tempos no ciclo de vida de célula) no mesmo nível. Promotores induzíveis, inversamente, são ativos (ou tornados inativos) ou são significativamente regulados ascendentemente ou descendentemente somente em resposta a um estímulo. Os dois tipos de promotores encontram aplicação nos métodos da invenção. Promotores induzíveis úteis na invenção incluem aqueles que mediam transcrição de um gene operativamente ligado em resposta a um estímulo, como uma molécula pequena exogenamente fornecida (por exemplo, glicose como em SEQ ID NO: 1), temperatura (calor ou frio), falta de nitrogênio em meio de cultura, etc. Promotores apropriados podem ativar a transcrição de um gene essencialmente silencioso ou regular ascendentemente, preferivelmente substancialmente, transcrição de um gene operativamente ligado que é transcrito em um nível baixo.

[00155] A inclusão de sequência de controle de região de terminação é

opcional, e se empregada, então a escolha deve ser principalmente uma de conveniência, como a região de terminação é relativamente intercambiável. A região de terminação pode ser nativa à região de iniciação de transcrição (o promotor), pode ser nativa à sequência de DNA de interesse, ou pode ser obtível de outra fonte. Vide, por exemplo, Chen e Orozco, *Nucleic Acids Res.* (1988) 16:8411.

[00156] A presente invenção também provê sequências de controle e genes recombinantes e vetores contendo as mesmas que fornecem a expressão compartimentalizada de um gene de interesse. Organelas para direcionamento são cloroplastos, plastídios, mitocôndrias, e retículo endoplásmico. Além disso, a presente invenção provê sequências de controle e genes recombinantes e vetores contendo os mesmos que fornecem a secreção de uma proteína fora da célula.

[00157] Proteínas expressas no genoma nuclear de *Prototheca* podem ser direcionados para o plastídio utilizando sinais de direcionamento para plastídio. Sequências de direcionamento para plastídio endógenas a *Chlorella* são conhecidas, como genes no genoma nuclear *Chlorella* que codificam proteínas que são direcionadas ao plastídio; vide por exemplo, números de acesso GenBank AY646197 e AF499684, e em uma modalidade, tais sequências de controle são utilizadas nos vetores da presente invenção para direcionar expressão de uma proteína para um plastídio de *Prototheca*.

[00158] Os Exemplos abaixo descrevem o uso de sequências de direcionamento para plastídio de alga para direcionar proteínas heterólogas para o compartimento correto na célula hospedeira. Bibliotecas de cDNA foram feitas utilizando células *Prototheca moriformis* e *Chlorella protothecoides* e são descritas nos exemplos 12 e exemplo 11 abaixo. Sequências foram BLASTed e analisadas para homologia com proteínas conhecidas que negociam para o plastídio/cloroplasto. Os cDNAs que codificam essas proteínas foram clonados e sequências de direcionamento

para plastídio foram isolados desses cDNAs. As sequências e aminoácidos das sequências de direcionamento para plastídio de algas identificadas das bibliotecas de cDNA e as sequências de aminoácidos de tioesterase ACP-acila graxa de planta que são utilizadas nos Exemplos de expressão heteróloga, abaixo, são listadas nas SEQ ID Nos: 127-133.

[00159] Em outra modalidade da presente invenção, a expressão de um polipeptídeo em *Prototheca* é direcionada ao retículo endoplasmático. A inclusão de uma retenção apropriada ou sinal de separação em um vetor de expressão assegura que proteínas são retidas no retículo endoplasmático (ER) e não vão à jusante no Golgi. Por exemplo, o vetor IMPACTVECTOR1,3, de Wageningen UR-Plant Research International, inclui o sinal de separação ou retenção KDEL bem conhecido. Com esse vetor, retenção de ER tem uma vantagem prática em que foi relatado como aperfeiçoando níveis de expressão 5 ou mais vezes. O principal motivo para isso parece ser que o ER contém concentrações mais baixas e/ou diferentes proteases responsáveis por degradação pós-tradução de proteínas expressas do que estão presentes no citoplasma. Sinais de retenção ER funcionais em microalgas verdes são conhecidos. Por exemplo, vide Proc Natl Acad Sci USA 26 de abril de 2005; 102 (17): 6224-30.

[00160] Em outra modalidade da presente invenção, um polipeptídeo é direcionado para secreção para fora da célula no meio de cultura. Vide Hawkins e outros, Current Microbiology Vo. 38(1999), pág. 335-341 para exemplos de sinais de secreção ativos em *Chlorella* que podem ser utilizados, de acordo com os métodos da invenção, em *Prototheca*.

## **B. Genes e otimização de códon**

[00161] Tipicamente, um gene inclui um promotor, sequência de codificação, e sequências de controle de terminação. Quando montado por tecnologia de DNA recombinante, um gene pode ser denominado um cassete de expressão e pode ser flanqueado por sítios de restrição para inserção



conveniente em um vetor que é utilizado para introduzir o gene recombinante em uma célula hospedeira. O cassete de expressão pode ser flanqueado por sequências de DNA a partir do genoma ou outro ácido nucléico alvo para facilitar integração estável do cassete de expressão no genoma por recombinação homóloga. Alternativamente, o vetor e seu cassete de expressão podem permanecer não integrados, em cujo caso, o vetor inclui tipicamente uma origem de replicação, que é capaz de fornecer replicação do DNA de vetor heterólogo.

[00162] Um gene comum presente em um vetor é um gene que codifica uma proteína, cuja expressão permite que a célula recombinante contendo a proteína seja diferenciada das células que não expressam a proteína. Tal gene, e seu produto de gene correspondente, é chamado marcador selecionável. Qualquer de uma ampla variedade de marcadores selecionáveis pode ser empregado em um construto de transgene útil para transformar *Prototheca*. Os exemplos de marcadores selecionáveis apropriados incluem o gene de resistência G418, o gene de reductase de nitrato (vide Dawson e outros. (1997), Current Microbiology 35:356-362), o gene de fosfotransferase de (HPT; vide Kim e outros. (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73), o gene de fosfotransferase de neomicina, e o gene ble, que confere Resistência a bleomicina (Huang e outros. (2007), Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:197-205). Os métodos de determinar sensibilidade de microalgas a antibióticos são bem conhecidos. Por exemplo, Mol Gen Genet. 16 de outubro 1996;252(5):572-9.

[00163] Para fins da presente invenção, o vetor de expressão utilizado para preparar uma célula hospedeira recombinante da invenção incluirá pelo menos dois, e freqüentemente três genes, se um dos genes for um marcador selecionável. Por exemplo, um *Prototheca* geneticamente construído da invenção pode ser feito por transformação com vetores da invenção que compreendem, além de um marcador selecionável, um ou mais genes

exógenos, como por exemplo, gene de invertase sacarose ou gene de tioesterase-ACP acila. Um ou ambos os genes podem ser expressos utilizando um promotor induzível, que permite que o timing relativo de expressão desses genes seja controlado para aumentar o rendimento de lipídeo e conversão em ésteres de ácido graxo. A expressão dos dois ou mais genes exógenos pode estar sob controle do mesmo promotor induzível ou sob controle de promotores induzíveis diferentes (ou constitutivos). Na situação mencionada por último, a expressão de um primeiro gene exógeno pode ser induzida por um primeiro período de tempo (durante o qual expressão de um segundo gene exógeno pode ser induzido ou não) e expressão de um segundo gene exógeno pode ser induzida por um segundo período de tempo (durante o qual expressão de um primeiro gene exógeno pode ser induzido ou não).

[00164] Em outras modalidades, dois ou mais genes exógenos (além de qualquer marcador selecionável) são: uma tioesterase ACP-acila graxa e uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa, cuja ação combinada fornece um produto de álcool. são fornecidas adicionalmente outras combinações de genes exógenos, incluindo sem limitação, uma tioesterase ACP-arila graxa e uma reductase CoA-acila graxa para gerar aldeídos. Em uma modalidade, o vetor provê a combinação de um tioestearase ACP-acila graxa, uma reductase CoA-acila graxa, e um decarbonilase de aldeído graxo para gerar alcanos. Em cada dessas modalidades, um ou mais dos genes exógenos pode ser expresso utilizando um promotor induzível.

[00165] Outros vetores ilustrativos da invenção que expressam dois ou mais genes exógenos incluem aqueles que codificam tanto um transportador de sacarose e uma enzima de invertase de sacarose como aqueles que codificam tanto um marcador selecionável e uma invertase de sacarose secretada. O *Prototheca* recombinante transformado com qualquer tipo de vetor produz lipídeos em custo de fabricação mais baixo devido à capacidade construída de utilizar cana de açúcar (e açúcares derivados de cana de açúcar)

como uma fonte de carbono. A inserção dos dois genes exógenos descritos acima pode ser combinada com a ruptura de biossíntese de polissacarídeo através de mutagênese dirigida e/ou aleatória, que orienta fluxo de carbono sempre maior para produção de lipídeo. Individualmente e em combinação, conversão trófica, engenharia para alterar produção de lipídeos e tratamento com enzimas exógenas alteram a composição de lipídeo produzida por um microorganismo. A alteração pode ser uma mudança na quantidade lipídeos produzidos, a quantidade de uma ou mais espécies de hidrocarboneto produzidas em relação a outros lipídeos, e/ou os tipos de espécie de lipídeo produzidas no microorganismo. Por exemplo, microalgas podem ser construídas para produzir uma quantidade e/ou percentagem mais elevada de TAGs.

[00166] Para expressão ótima de uma proteína recombinante, é vantajoso empregar sequências de codificação que produzem mRNA com códons preferencialmente utilizados pela célula hospedeira para serem transformados. Desse modo, a expressão adequada de transgenes pode exigir que o uso de códon do transgene case com a polarização específica de códon do organismo no qual o transgene está sendo expresso. Os mecanismos precisos subordinados a esse efeito são muitos, porém incluem o equilíbrio adequado de pools de RNA aminoacilados disponíveis com proteínas sendo sintetizadas na célula, acoplados à tradução mais eficiente do RNA mensageiro transgênico (mRNA) quando essa necessidade é atendida. Quando uso de códon no transgene não é otimizado, pools de tRNA disponíveis não são suficientes para permitir tradução eficiente do mRNA heterólogo resultando em perda ribossomal e terminação e possível instabilidade do mRNA transgênico.

[00167] A presente invenção provê ácidos nucleicos otimizados pro códon úteis para a expressão bem sucedida de proteínas recombinantes em *Prototheca*. O uso de códon em espécies de *Prototheca* foi analisado por

estudar sequências de cDNA isoladas de *Prototheca moriformis*. Essa análise representa a interrogação sobre 24,000 códons e resultou na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Uso preferido de códon em cepas de *Prototheca*.

Ala	GGC	345 (0,36)	Asn	AAT	8 (0,04)
	GCA	66 (0,07)		AAC	201 (0,96)
	GCT	101 (0,11)	Pro	CCG	161 (0,29)
	GCC	442 (0,46)		CCA	49 (0,09)
Cys	TGT	12 (0,10)		CCT	71 (0,13)
	TGC	105 (0,90)		CCC	267 (0,49)
Asp	GAT	43 (0,12)	Gln	CAG	226 (0,82)
	GAC	316 (0,88)		CAA	48 (0,18)
Glu	GAG	377 (0,96)	Arg	AGG	33 (0,06)
	GAA	14 (0,04)		AGA	14 (0,02)
Phe	TTT	89 (0,29)		CGG	102 (0,18)
	TTC	216 (0,71)		CGA	49 (0,08)
				CGT	51 (0,09)
Gly	GGG	92 (0,12)	Ser	CGC	331 (0,57)
	GGA	56 (0,07)		AGT	16 (0,03)
	GGT	76 (0,10)		AGC	123 (0,22)
	GGC	559 (0,71)		TCG	152 (0,28)
His	CAT	42 (0,21)		TCA	31 (0,06)
	CAC	154 (0,79)		TCT	55 (0,10)
Ile	ATA	4 (0,01)	Thr	TCC	173 (0,31)
	ATT	30 (0,08)		ACG	184 (0,38)
	ATC	338 (0,91)		ACA	24 (0,05)
Lys	AAG	284 (0,98)		ACT	21 (0,05)
	AAA	7 (0,02)	Val	ACC	249 (0,52)
Leu	TTG	26 (0,04)		GTG	308 (0,50)
	TTA	3 (0,00)		GTA	9 (0,01)
	CTG	447 (0,61)		GTT	35 (0,06)
	CTA	20 (0,03)		GTC	262 (0,43)
	CTT	45 (0,06)	Trp	TGG	107 (1,00)

CTC	190 (0,26)	Tyr	TAT	10 (0,05)
			TAC	180 (0,95)

[00168] Em outras modalidades, o gene no vetor recombinante foi otimizado por códon com referência a uma cepa de microalgas diferente de uma cepa de *Prototheca*. Por exemplo, métodos de recodificar genes para expressão e microalgas são descritos na patente US número 7.135.290. Informações adicionais para otimização de códon são disponíveis, por exemplo, no banco de dados de uso de códon de GenBank.

[00169] Embora os métodos e materiais da invenção permitam a introdução de qualquer gene exógeno em *Prototheca*, genes referentes à utilização de sacarose e modificação de via de lipídeo são de interesse específico, como discutido nas seguintes seções.

#### IV. UTILIZAÇÃO DE SACAROSE

[00170] Na modalidade, a célula de *Prototheca* recombinante da invenção contém ainda um ou mais genes de utilização de sacarose exógeno. Em várias modalidades, um ou mais genes codificam uma ou mais proteínas selecionadas do grupo que consiste em uma frutocinase, uma glucocinase, uma hexocinase, uma invertase de sacarose, um transportador de sacarose. Por exemplo, a expressão de um transportador de sacarose e uma invertase de sacarose permite que *Prototheca* transporte sacarose para a célula a partir do meio de cultura e hidrolise sacarose para fornecer glicose e frutose. Opcionalmente, uma frutocinase pode ser expressa também em casos onde atividade de hexocinase endógena é insuficiente para fosforilação máxima de frutose. Os exemplos de transportadores de sacarose apropriados são números de acesso Genbank CAD91334, CAB92307 e CAA53390, Os exemplos de frutocinases apropriados são números de acesso Genbank P26984, P26420 e CAA43322.

[00171] Em uma modalidade, a presente invenção provê uma célula hospedeira de *Prototheca* que secreta uma invertase de sacarose. A secreção

de uma invertase de sacarose evita a necessidade de expressão de um transportador que pode transportar sacarose para a célula. Isso é porque uma invertase secretada catalisa a conversão de uma molécula de sacarose em uma molécula de glicose e uma molécula de frutose, as quais podem ser ambas transportadas e utilizadas por micróbios fornecidos pela invenção. Por exemplo, a expressão de uma invertase de sacarose (como SEQ ID NO: 3) com um sinal de secreção (como aquele de SEQ ID NO: 4 (de levedura), SEQ ID NO: 5 (de plantas superiores), SEQ ID NO: 6 (sinal de secreção de consenso eucariótico) e SEQ ID NO: 7 (combinação de sequência de sinal de plantas superiores e consenso eucariótico) gera atividade de invertase fora da célula. A expressão de tal proteína, como permitido pela metodologia de engenharia genética revelada aqui, permite que células já capazes de utilizar glicose extracelular como uma fonte de energia utilizem sacarose como uma fonte de energia extracelular.

[00172] As espécies de *Prototheca* que expressam uma invertase em meio contendo sacarose são uma espécie de microalga preferida para a produção de óleo. O exemplo 3 ilustra como os métodos e reagentes da invenção podem ser utilizados para expressar uma invertase de levedura recombinante e secretar a mesma de uma célula de *Prototheca* recombinante. A expressão e direcionamento extracelular dessa proteína totalmente ativa permitem que as células hospedeiras resultantes cresçam em sacarose, ao passo que suas cópias não transformadas não podem. Desse modo, a presente invenção provê células recombinantes de *Prototheca* com um gene de invertase otimizado por códon incluindo, porém não limitado, ao gene de invertase de levedura, integrado em seu genoma de tal modo que o gene de invertase é expresso como avaliado por atividade de invertase e hidrólise de sacarose. A presente invenção também provê genes de invertase úteis como marcadores selecionáveis em células recombinantes de *Prototheca*, visto que tais células são capazes de crescer em sacarose, enquanto suas cópias não

transformadas não podem; e métodos para selecionar células hospedeiras recombinantes utilizando uma invertase como um marcador selecionável potente para genética molecular de algas.

[00173] A expressão bem sucedida de uma invertase de sacarose em *Prototheca* também ilustra outro aspecto da presente invenção em que demonstra que proteínas heterólogas (recombinantes) podem ser expressas na célula de algas e transita com sucesso fora da célula e para dentro do meio de cultura em uma forma funcional e totalmente ativa. Desse modo, a presente invenção provê métodos e reagentes para expressar um conjunto amplo e diverso de proteínas heterólogas em microalgas e secretar as mesmas fora da célula hospedeira. Tais proteínas incluem, porém exemplo, enzimas industriais como, por exemplo, lípases, proteases, celulasas, pectinases, amilases, esterases, oxidoreductases, transferases, lactases, isomerases, e invertases, bem como proteínas terapêuticas como, por exemplo, fatores de crescimento, citosinas, anticorpos de comprimento total compreendendo duas cadeias leves e duas pesadas, Fabs, scFvs (fragmento variável de cadeia única), anticorpos do tipo camellid, fragmentos de anticorpo, fusões-fragmento de anticorpo, fusões de receptor-anticorpo, insulina, interferons, e fatores de crescimento semelhantes à insulina.

[00174] A expressão bem sucedida de uma invertase de sacarose em *Prototheca* também ilustra outro aspecto da presente invenção em que provê métodos e reagentes para o uso de peptídeos de trânsito de fungo em algas para dirigir a secreção de proteínas em *Prototheca*; e métodos e reagentes para determinar se um peptídeo pode funcionar, e a capacidade do mesmo funcionar, como um peptídeo de trânsito em células de *Prototheca*. Os métodos e reagentes da invenção podem ser utilizados como uma ferramenta e plataforma para identificar outros peptídeos de trânsito que podem negociar com sucesso proteínas fora de uma célula, e que a invertase de levedura tem grande utilidade nesses métodos. Como demonstrado nesse exemplo, a

remoção do peptídeo de trânsito de invertase de levedura endógena e sua substituição por outros peptídeos de trânsito, endógeno para a alga hospedeira ou de outras fontes (eucariótico, procariótico e viral) pode identificar se qualquer peptídeo de interesse pode funcionar como um peptídeo de trânsito em guiar saída de proteína da célula.

[00175] Os exemplos de invertases de sacarose apropriadas incluem aquelas identificadas por números de acesso Genbank CAB95010, NP\_012104 e CAA06839. Exemplos não limitadores de invertases apropriadas são listados abaixo na Tabela 2. Sequências de aminoácidos para cada invertase listada são incluídas na Listagem de sequência abaixo. Em alguns casos, o gene de utilização de sacarose exógeno apropriado para uso nos métodos e vetores da invenção codifica uma invertase de sacarose que tem pelo menos 40, 50, 60, 75, ou 90% ou identidade de aminoácido mais elevada com uma invertase de sacarose selecionada da Tabela 2.

Tabela 2. Invertases de sacarose.

Descrição	Organismo	No. de acesso Genbank	SEQ ID NO:
Invertase	<i>Chicorium intybus</i>	Y11124	SEQ ID NO:20
Invertase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	AB011433	SEQ ID NO:21
beta-frutofuranosidase (invertase)	<i>Pichia anomala</i>	X80640	SEQ ID NO:22
Invertase	<i>Debaryomyces occidentalis</i>	X17604	SEQ ID NO:23
Invertase	<i>Oryza sativa</i>	AF019113	SEQ ID NO:24
Invertase	<i>Allium cepa</i>	AJ006067	SEQ ID NO:25
Invertase	<i>Beta vulgaris subsp. Vulgaris</i>	AJ278531	SEQ ID NO:26
beta-frutofuranosidase (invertase)	<i>Bifidobacterium breve UCC2003</i>	AAT28190	SEQ ID NO:27
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012104	SEQ ID NO:8 (nucleotídeo) SEQ ID NO:28 (aminoácido)
Invertase A	<i>Zymomonas mobilis</i>	AAO38865	SEQ ID NO:29

[00176] A secreção de uma invertase para o meio de cultura por *Prototheca* permite que as células cresçam também em melado de refugo de



processamento de cana de açúcar como o fazem em glicose do tipo reagente puro; o uso desse produto de refugo de baixo valor de processamento de cana de açúcar pode fornecer economia significativa de custo na produção de lipídeos e outros óleos. Desse modo, a presente invenção provê uma cultura microbiana contendo uma população de microorganismos de *Prototheca*, e um meio de cultura compreendendo (i) sacarose e (ii) uma enzima de invertase de sacarose. Em várias modalidades a sacarose na cultura vem de sorgo, beterraba, cana de açúcar, melado, ou material celulósico despolimerizado (que pode conter opcionalmente lignina). Em outro aspecto, os métodos e reagentes da invenção aumentam significativamente o número e tipo de insumos que podem ser utilizados por *Prototheca* recombinante. Embora os micróbios exemplificados aqui sejam alterados de tal modo que possam utilizar sacarose, os métodos e reagentes da invenção podem ser aplicados de modo que os insumos como celulósicos sejam utilizados por um micróbio hospedeiro construído da invenção com a capacidade de secretar celulasas, pectinases, isomerases, ou similares, de tal modo que os produtos de ruptura das reações enzimáticas não sejam mais simplesmente tolerados porém em vez disso utilizados como uma fonte de carbono pelo hospedeiro.

## **V. ENGENHARIA DE VIA DE LIPÍDEO**

[00177] Além de alterar a capacidade de *Prototheca* utilizar insumos como insumos contendo sacarose, a presente invenção também provê *Prototheca* recombinante que foi modificada para alterar as propriedades e/ou proporções de lipídeos produzidos. A via pode ser adicionalmente, ou alternativamente, modificada para alterar as propriedades e/ou proporções de várias moléculas de lipídeo produzidas através de processamento enzimático de lipídeos e intermediários na via de ácido graxo. Em várias modalidades, as células de *Prototheca* recombinantes da invenção têm, em relação a suas cópias não transformadas, rendimento de lipídeo otimizado por volume de unidade e/ou por tempo unitário, comprimento de cadeia de carbono (por

exemplo, para produção diesel renovável ou para aplicações químicas industriais que exigem insumo de lipídeo), número reduzido de ligações duplas ou triplas, opcionalmente para zero, e aumento da razão de hidrogênio : carbono de uma espécie específica de lipídeo ou de uma população de lipídeo distinto.

[00178] Em modalidades específicas, uma ou mais enzimas chaves que controlam pontos de ramificação em metabolismo para síntese de ácido graxo foram reguladas ascendentemente ou reguladas descendentemente para melhorar a produção de lipídeo. A regulação ascendente pode ser obtida, por exemplo, por transformar células com construtos de expressão nos quais um gene que codifica a enzima de interesse é expresso, por exemplo, utilizando um promotor forte e/ou elementos intensificadores que aumentam a transcrição. Tais construtos podem incluir um marcador selecionável de tal modo que os transformantes possam ser submetidos à seleção, que pode resultar em amplificação do construto e um aumento no nível de expressão da enzima codificada. Os exemplos de enzimas apropriadas para regulação ascendente de acordo com os métodos da invenção incluem desidrogenase piruvato, que desempenha um papel na conversão de piruvato em acetila-CoA (exemplos alguns de microalgas, incluem números de acesso Genbank NP\_415392; AAA53047; Q1XDM1; e CAF05587). A regulação ascendente de desidrogenase piruvato pode aumentar a produção de acetil-CoA, e desse modo aumentar a síntese de ácido graxo. Acetil-CoA carboxilase catalisa a etapa inicial em síntese de ácido graxo. Por conseguinte, essa enzima pode ser regulada ascendentemente para aumentar a produção de ácidos graxos (exemplos, alguns de microalgas, incluem números de acesso Genbank BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP\_537052; YP\_536879; NP\_045833; e BAA57908). A produção de ácido graxo pode ser também aumentada por regulação ascendente de proteína portadora acila (ACP), que transporta as cadeias de acila em crescimento durante síntese de ácido graxo (exemplos,

alguns de microalgas, incluem números de acesso Genbank A0T0F8; P51280; NP\_849041; YP\_874433). Acil transferase de glicerol-3-fosfato catalisa a etapa de limitar taxa de síntese de ácido graxo. A regulação ascendente dessa enzima pode aumentar a produção de ácido graxo (exemplos, alguns de microalgas, incluem números de acesso Genbank AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857; e ABO94442).

[00179] A regulação ascendente e/ou descendente de genes pode ser aplicada a reguladores globais que controlam a expressão dos genes das vias biossintéticas de ácido graxo. Por conseguinte, um ou mais reguladores globais de síntese de ácido graxo podem ser reguladores ascendentemente ou descendentemente, como apropriado, para inibir ou aumentar, respectivamente, a expressão de uma pluralidade de genes sintéticos de ácido graxo e finalmente aumentar a produção de lipídeo. Os exemplos incluem proteínas de ligação de elemento regulador de esterol (SREBPs), como SREBP-1a e SREBP-1c (por exemplo, vide números de acesso Genbank NP\_035610 e Q9WTN3).

[00180] A presente invenção também provê células de *Prototheca* recombinantes que foram modificadas para conter um ou mais genes exógenos que codificam enzimas de modificação de lipídeo como, por exemplo, tioesterases ACP-acila graxa (vide a Tabela 3), reductases de aldeído/CoA-acila graxa (vide a Tabela 4), reductases CoA-acila graxa (vide a Tabela 5), decarbonilase de aldeído graxo (vide a Tabela 6), reductases de aldeído graxo, e sintases de esqualeno (vide número de Acesso Genbank AF205791). Em algumas modalidades, genes que codificam uma tioesterase ACP-acila graxa e uma proteína portadora de acila naturalmente coexpressa são transformados em uma célula de *Prototheca*, opcionalmente com um ou mais genes que codificam outras enzimas de modificação de lipídeos. Em outras modalidades, o ACP e o tioesterase ACP-acila graxa podem ter uma afinidade entre si que transmite uma vantagem quando as duas são utilizadas

juntas nos micróbios e métodos da presente invenção, independente de se são ou não naturalmente coexpressas em um tecido ou organismo específico. Desse modo, a presente invenção considera tanto pares naturalmente co-expressos dessas enzimas como aqueles que partilham uma afinidade para interagir entre si para facilitar clivagem de uma cadeia de carbono específico de comprimento da ACP.

[00181] Ainda em outras modalidades, um gene exógeno que codifica uma desaturase é transformado na célula de *Prototheca* em combinação com um ou mais genes codificando outras enzimas de modificação de lipídeo para fornecer modificações com relação à saturação de lipídeo. Desaturase ACP-estearoíla (vide, por exemplo, números de acesso GenBank AAF15308; ABM45911; e AAY86086), por exemplo, catalisa a conversão de estearoíla-ACP em oleoíla-ACP. A regulação ascendente desse gene pode aumentar a proporção de ácidos graxos monoinsaturados produzidos por uma célula; ao passo que a regulação descendente pode reduzir a proporção de monoinsaturados. Similarmente, a expressão de uma ou mais desaturases de glicerolipídeo pode ser controlada para alterar a razão de ácidos graxos insaturados para saturados como  $\omega$ -6 desaturase de ácido graxo,  $\omega$ -3 desaturase de ácido graxo, ou  $\omega$ -6-oleato desaturase. Em algumas modalidades, a desaturase pode ser selecionada com referência a um comprimento de cadeia de carbono desejado, de tal modo que a desaturase seja capaz de fazer modificações específicas de local em um substrato de comprimento de carbono especificado, ou substratos tendo um comprimento de carbono em uma faixa especificada.

[00182] Desse modo, em modalidades específicas, micróbios da presente invenção são geneticamente construídos para expressar um ou mais genes exógenos selecionados de uma tioesterase ACP-acila, uma reductase de aldeído/CoA-acila, uma reductase CoA-acila graxa, uma reductase de aldeído graxo, um decarbonilase de aldeído graxo, ou uma proteína portadora de acila

naturalmente co-expressa. Métodos de expressão apropriados são descritos acima com relação à expressão de um gene de lipase, incluindo, entre outros métodos, expressão induzível e expressão compartimentalizada. Uma tioesterase ACP- acila graxa cliva um ácido graxo de uma proteína portadora de acila (ACP) durante síntese de lipídeo. Através de processamento enzimático adicional, o ácido graxo clivado é então combinado com uma coenzima para fornecer uma molécula CoA-acila. Essa acila-CoA é o substrato para a atividade enzimática de uma reductase de CoA-acila graxa para fornecer um aldeído, bem como para uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa para fornecer um álcool. O aldeído produzido pela ação da reductase de CoA-acila graxa identificada acima é o substrato para atividade enzimática adicional por uma reductase de aldeído graxo para fornecer um álcool, ou uma decarbonilase de aldeído graxo para fornecer um alcano ou alceno.

[00183] Em algumas modalidades, ácidos graxos, glicerolipídeos, ou os alcoóis primários correspondentes, aldeídos, alcanos ou alcenos, gerados pelos métodos descritos aqui, contêm 8, 10, 12 ou 14 átomos de carbono. Ácidos graxos preferidos para a produção de diesel, biodiesel, diesel renovável, ou combustível de jato, ou os alcoóis primários correspondentes, aldeídos, alcanos e alcenos, para aplicações industriais contêm 8 a 14 átomos de carbono. Em certas modalidades, os ácidos graxos acima, bem como as outras moléculas de hidrocarboneto correspondentes, são saturadas (sem ligações duplas ou triplas de carbono-carbono); mono insaturadas (ligação dupla única); poli insaturadas (duas ou mais ligações duplas); são lineares (não cíclicas) ou ramificadas. Para produção de combustível, saturação maior é preferida.

[00184] As enzimas descritas diretamente acima têm uma especificidade preferencial para hidrólise de um substrato contendo um número específico de átomos de carbono. Por exemplo, uma tioesterase ACP-

acila graxa pode ter uma preferência para clivar um ácido graxo tendo 12 átomos de carbono a partir do ACP. Em algumas modalidades, o ACP e a tioesterase específica de comprimento podem ter uma afinidade entre si que as torna particularmente úteis como uma combinação (por exemplo, os genes de tioesterase e ACP exógeno podem ser co-expressos naturalmente em um tecido ou organismo específico a partir do qual são derivados). Portanto, em várias modalidades, a célula de *Prototheca* recombinante da invenção pode conter um gene exógeno que codifica uma proteína com especificidade para catalisar uma atividade enzimática (por exemplo, clivagem de um ácido graxo de um ACP, redução de uma acila-CoA para um aldeído ou um álcool, ou conversão de um aldeído em um alceno) com relação ao número de átomos de carbono contidos 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 8 a 14 átomos de carbono. Uma especificidade preferida é para um substrato tendo menos, isto é, 12, em vez de mais, isto é, 18, átomos de carbono.

[00185] Em exemplos não limitadores, porém, ilustrativos, a presente invenção provê vetores e células hospedeiras de *Prototheca* que expressam uma tioesterase exógena e por conseguinte produzem lipídeo enriquecido, em relação ao perfil de lipídeo de células de *Prototheca* não transformadas, no comprimento de cadeia para o qual a tioesterase é específica. As tioesterases ilustradas são (i) *Cinnamomum camphorum* FatB1 (No. De acesso GenBank. Q39473, a sequência de aminoácido está em SEQ ID NO: 59, sequência de aminoácido sem sequência de direcionamento para plastídio (PTS) está em SEQ ID NO: 139, e sequência de cDNA otimizada por códon baseada na tabela 1 está na SEQ ID NO: 60), que tem preferência para substrato ACP-acila graxa com um comprimento de cadeia de carbono de 14; (ii) *Cuphea hookeriana* FatB2 (No de acesso GenBank. AAC49269, sequência de aminoácido está na SEQ ID NO: 61, sequência de aminoácido

sem PTS está na SEQ ID NO: 138, e sequência de cDNA otimizada por códon baseada na tabela 1 está na SEQ ID NO: 62), que tem preferência para um substrato ACP-acila graxa com um comprimento de cadeia de carbono de 8-10; e (iii) *Umbellularia* Fat B1 (No. De acesso GenBank Q41635, sequência de aminoácido está incluída na SEQ ID NO: 63, sequência de aminoácido sem PTS está na SEQ ID NO: 139, e sequência de cDNA otimizada por códon com base na Tabela 1 é incluída na SEQ ID NO: 64), que tem uma preferência para um substrato ACP-acila graxa com um comprimento de cadeia de carbono de 12,

[00186] Outras tioesterase ACP-acila graxa apropriadas para uso com os micróbios e métodos da invenção incluem, sem limitação, aquelas listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Tioestearase ACP-acila graxa e números de acesso GenBank

<i>Umbellularia californica</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAC49001)
<i>Cinnamomum camphora</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #Q39473)
<i>Umbellularia californica</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #Q41635)
<i>Myristica fragrans</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAB71729)
<i>Myristica fragrans</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAB71730)
<i>Elaeis guineensis</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #ABD83939)
<i>Elaeis guineensis</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAD42220)
<i>Populus tomentosa</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #ABC47311)
<i>Arabidopsis thaliana</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #NP_172327)
<i>Arabidopsis thaliana</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #CAA85387)
<i>Arabidopsis thaliana</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #CAA85388)
<i>Gossypium hirsutum</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #Q9SQI3)
<i>Cuphea lanceolata</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #CAA54060)
<i>Cuphea hookeriana</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAC72882)
<i>Cuphea calophylla</i> subsp. <i>mesostemon</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #ABB71581)
<i>Cuphea lanceolata</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #CAC19933)
<i>Elaeis guineensis</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAL15645)
<i>Cuphea hookeriana</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #Q39513)
<i>Gossypium hirsutum</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAD01982)
<i>Vitis vinifera</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #CAN81819)
<i>Garcinia mangostana</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAB51525)
<i>Brassica juncea</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #ABI18986)
<i>Madhuca longifolia</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAX51637)
<i>Brassica napus</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #ABH11710)
<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-grupo) acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #EAY86877)
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-grupo) acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #NP_001068400)
<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-grupo) acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #EAY99617)
<i>Cuphea hookeriana</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAC49269)
<i>Ulmus Americana</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAB71731)
<i>Cuphea lanceolata</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #CAB60830)
<i>Cuphea palustris</i> acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAC49180)

*Iris germanica* acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAG43858)  
*Cuphea palustris* acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #AAC49179)  
*Myristica fragrans* acila graxa-ACP tioesterase (GenBank# AAB71729)  
*Cuphea hookeriana* acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #U39834)  
*Umbellularia californica* acila graxa-ACP tioesterase (GenBank # M94159)  
*Cinnamomum camphora* acila graxa-ACP tioesterase (GenBank #U31813)

[00187] Os Exemplos abaixo descrevem o direcionamento bem sucedido e expressão de tioesterase ACP-acila graxa heterólogos de *Cuphea hookeriana*, *Umbellularia californica*, *Cinnamomum camphora* nas espécies *Prototheca*. Adicionalmente, alterações em perfis de ácido graxo foram confirmados na expressão de células hospedeiras desses tioesterases ACP-acila graxa heterólogos. Esses resultados foram bem inesperados dada a ausência de identidade de sequência entre tioesterases de plantas superiores e algas em geral, e entre tioesterase ACP-acila graxa *Prototheca moriformis* e as tioesterases ACP-acila graxa heterólogas acima listadas. Duas tioesterases ACP-acila *Prototheca moriformis* foram isoladas e sequenciadas. As sequências dos dois cDNAs mostraram um alto grau de identidade entre si, diferindo em somente 12 posições no nível de nucleotídeo e cinco posições no nível de aminoácido, quatro desses no peptídeo de trânsito de plastídio. A análise adicional de sequência genômica de *Prototheca moriformis* confirmou que esses dois cDNAs foram realmente codificados em contigs separados, e embora altamente homólogos, são codificados por dois genes distintos. O cDNA e sequência de aminoácidos dos dois tioesterase ACP-acila graxa *Prototheca moriformis*, tioesterase-1 ACP-acila graxa P. moriformis e tioesterase-2 ACP-acila graxa P. moriformis são listados como SEQ IDN OS: 134-137.

[00188] Quando as sequências de aminoácidos desses dois cDNAs foram BLASTed contra o banco de dados NCBI, as duas sequências mais homólogas foram tioesterases ACP-acila graxa de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Arabidopsis thaliana*. Surpreendentemente, o nível de identidade de aminoácido entre as tioesterases ACP-acila graxa *Prototheca moriformis* e tioesterases de planta superior foi relativamente baixo, somente em 49 e 37%



de identidade. Além disso, há também uma diferença sutil nas sequências que circundam a porção terminal amino do tríade catalítico (NXHX<sub>36</sub>C) entre esses tioesterases ACP-acila graxa. Trinta e nove de quarenta tioesterases ACP-acila graxa de planta superior pesquisadas mostraram a sequência LDMNQH que circunda os resíduos N e H na extremidade amino do tríade, enquanto todas as sequências de algas identificadas tiveram a sequência MDMNGH. Dada a identidade de sequência de aminoácidos baixa e as diferenças que circundam o tríade catalítico dos tioesterases, os resultados bem sucedidos de expressão de tioesterases ACP-acila graxa exógenos obtidos e descritos nos exemplos foram inesperados, particularmente dado o fato de que a atividade das tioesterases ACP-acila graxa exógena era dependente em uma interação de proteína-proteína funcional com a proteína portadora de acila *Prototheca* endógena.

[00189] Reductases de aldeído/CoA-acila graxa apropriados para uso com os micróbios e métodos da invenção incluem, sem limitação, aquelas listadas na Tabela 4.

Tabela 4: Reductases de aldeído/CoA--acila graxa listadas por números de acesso GenBank.

AAC45217, YP_047869, BAB85476, YP_001086217, YP_580344, YP_001280274, YP_264583, YP_436109, YP_959769, ZP_01736962, ZP_01900335, ZP_01892096, ZP_01103974, ZP_01915077, YP_924106, YP_130411, ZP_01222731, YP_550815, YP_983712, YP_001019688, YP_524762, YP_856798, ZP_01115500, YP_001141848, NP_336047, NP_216059, YP_882409, YP_706156, YP_001136150, YP_952365, ZP_01221833, YP_130076, NP_567936, AAR88762, ABK28586, NP_197634, CAD30694, NP_001063962, BAD46254, NP_001030809, EAZ10132, EAZ43639, EAZ07989, NP_001062488, CAB88537, NP_001052541, CAH66597, CAE02214, CAH66590, CAB88538, EAZ39844, AAZ06658, CAA68190, CAA52019, e BAC84377
---

[00190] Reductases CoA-acila graxa apropriadas para uso com os micróbios e métodos da invenção incluem, sem limitação, aqueles listados na Tabela 5.

Tabela 5. Reductases CoA-Acila graxa listadas por números de acesso 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
--

[00191] Decarbonilases de aldeído graxo apropriados para uso com os micróbios e métodos da invenção incluem, sem limitação, aqueles listados na tabela 6.

Tabela 6. Descarboxilases de aldeído graxo listados por números de acesso 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

[00192] Combinações de tioesterases ACP-acila graxa coexpressas naturalmente e proteínas portadoras de acila são apropriadas para uso com os micróbios e métodos da invenção.

[00193] Exemplos adicionais de enzimas de modificação de lipídeo ou hidrocarboneto incluem sequências de aminoácidos contidas em, referenciadas em, ou codificadas por sequências de ácido nucléico contidas ou referenciadas em, quaisquer 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 adicionalmente descritos em números de acesso GenBank: AAO18435; ZP\_00513891; Q38710; AAK60613; AAK60610; AAK60611; NP\_113747; CAB75874; AAK60612; AAF20201; BAA11024; AF205791; e CAA03710.

[00194] Outras enzimas apropriadas para uso com os micróbios e os métodos da invenção incluem aqueles que têm pelo menos 70% de identidade de aminoácido com uma das proteínas listadas nas Tabelas 3 a 6, e que apresentam a atividade enzimática desejada correspondente (por exemplo, clivagem de um ácido graxo de uma proteína portadora de acila, redução de uma acila-CoA em um aldeído ou um álcool, ou conversão de um aldeído em um alceno). Em modalidades adicionais, a atividade enzimática está presente em uma sequência que tem pelo menos aproximadamente 75%, pelo menos aproximadamente 80%, pelo menos aproximadamente 85%, pelo menos aproximadamente 90%, pelo menos aproximadamente 95%, ou pelo menos

aproximadamente 99% de identidade com uma das sequências descritas acima, todas as quais são pela presente incorporadas a título de referência como se totalmente expostas.

[00195] Selecionando a combinação desejada de genes exógenos a serem expressos, pode-se moldar o produto gerado pelo micróbio, que pode ser então extraído da biomassa aquosa. Por exemplo, o micróbio pode conter: (i) um gene exógeno que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa; e opcionalmente, (ii) uma proteína portadora de acila naturalmente co-expressa ou uma proteína portadora de acila de outro modo tendo afinidade para a tioesterase ACP-acila graxa (ou inversamente); e opcionalmente (iii) um gene exógeno que codifica uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa ou uma reductase de CoA-acila graxa; e opcionalmente, (iv) um gene exógeno que codifica uma reductase de aldeído graxo ou uma decarbonilase de aldeído graxo. O micróbio, sob condições de cultura descritas aqui, sintetiza um ácido graxo ligado a um ACP e a tioesterase ACP-acila graxa catalisa a clivagem do ácido graxo a partir do ACP para fornecer, através de processamento enzimático adicional, uma molécula de CoA-acila graxa. Quando presente, a reductase de aldeído/CoA-acila graxa catalisa a redução de acila-CoA em um álcool. Similarmente, a reductase de CoA-acila graxa, quando presente, catalisa a redução de acila-CoA em um aldeído. Naquelas modalidades nas quais um gene exógeno codificando uma reductase de CoA-acila graxa está presente e expresso para fornecer um produto de aldeído, uma reductase de aldeído graxo, codificada pelo terceiro gene exógeno, catalisa a redução do aldeído em um álcool. Similarmente, uma decarbonilase de aldeído graxo catalisa a conversão do aldeído em um alceno ou um alceno, quando presente.

[00196] Genes que codificam tais enzimas podem ser obtidos de células já conhecidas como apresentando produção significativa de lipídeos como *Chlorella protothecoides*. Genes já conhecidos como tendo um papel em produção de lipídeos, por exemplo, um gene codificando uma enzima que

satura ligações duplas, podem ser transformados individualmente em células receptoras. Entretanto, para pôr em prática a invenção não é necessário fazer suposições a priori com relação a quais genes são exigidos. Os métodos para identificar genes que podem alterar (melhorar) a produção de lipídeos em microalgas são descritos na publicação PCT número 2008/151149.

[00197] Desse modo, a presente invenção provê uma célula de *Prototheca* que foi genericamente construída para expressar uma enzima de via de lipídeo em um nível alterado em comparação com uma célula do tipo selvagem da mesma espécie. Em alguns casos, a célula produz mais lipídeo em comparação com a célula do tipo selvagem quando as duas células são cultivadas sob as mesmas condições. Em alguns casos, a célula foi geneticamente construída e/ou selecionada para expressar uma enzima de via de lipídeo em um nível mais elevado do que a célula do tipo selvagem. Em alguns casos, a enzima de via de lipídeo é selecionada do grupo que consiste em piruvato desidrogenase, acetil-CoA carboxilase, proteína portadora de acila, e aciltransferase de fosfato glicerol-3. Em alguns casos, a célula foi geneticamente construída e/ou selecionada para expressar uma enzima de via de lipídeo em um nível mais baixo do que a célula do tipo selvagem. Pelo menos em uma modalidade na qual a célula expressa a enzima de via de lipídeo em um nível mais baixo, a enzima de via de lipídeo compreende sintase de citrato.

[00198] Em algumas modalidades, a célula foi geneticamente construída e/ou selecionada para expressar um regulador global de síntese de ácido graxo em um nível alterado em comparação com a célula do tipo selvagem, pelo que os níveis de expressão de uma pluralidade de genes sintéticos de ácido graxo são alterados em comparação com a célula do tipo selvagem. Em alguns casos, a enzima de via de lipídeo compreende uma enzima que modifica um ácido graxo. Em alguns casos, a enzima de via de lipídeo é selecionada de uma desaturase ACP-estearoíla e uma desaturase de

glicerolípídeo.

[00199] Em outras modalidades, a presente invenção é dirigida a um micróbio que produz óleo contendo um ou mais genes exógenos, em que os genes exógenos codificam proteína(s) selecionada(s) do grupo que consiste em uma tioesterase ACP-acila graxa, uma reductase CoA-acila graxa, uma reductase de aldeído graxo, uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa, uma decarbonilase de aldeído graxo, e uma proteína portadora de acila. Em uma modalidade, o gene exógeno está em ligação operável com um promotor, que é induzível ou reprimível em resposta a um estímulo. Em alguns casos, o estímulo é selecionado do grupo que consiste em uma molécula pequena exogenamente fornecida, calor, frio e nitrogênio limitado ou sem nitrogênio no meio de cultura. Em alguns casos, o gene exógeno é expresso em um compartimento de células. Em algumas modalidades, o compartimento celular é selecionado do grupo que consiste em um cloroplasto, um plastídio e um mitocôndrio. Em algumas modalidades o micróbio é *Prototheca moriformis*, *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora* ou *Prototheca zopfii*.

[00200] Em uma modalidade, o gene exógeno codifica uma tioesterase ACP-acila de ácido graxo. Em alguns casos, a tioesterase codificada pelo gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos de uma proteína portadora 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 um ACP. Em uma modalidade, a tioesterase codificada pelo gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 12 carbonos de um ACP.

[00201] Em uma modalidade, o gene exógeno codifica uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa. Em alguns casos, a reductase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um CoA-acila graxa de 8 a 18 carbonos com um álcool primário correspondente. Em alguns casos, a reductase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um CoA-acila graxa de 10

a 14 carbonos com um álcool primário correspondente. Em uma modalidade, a reductase codificada pelo gene exógeno catalisa a redução de um CoA-acila graxa de 12 carbonos com dodecanol.

[00202] A presente invenção também provê uma célula *Prototheca* recombinante contendo dois genes exógenos, em que um primeiro gene exógeno codifica uma tioesterase ACP-acila graxa e um segundo gene exógeno codifica uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma reductase CoA-acila graxa, uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa, e uma proteína portadora de acila. Em alguns casos, os dois genes exógenos estão individualmente em ligação operável com um promotor, que é induzível em resposta a um estímulo. Em alguns casos, cada promotor é induzível em resposta a um estímulo idêntico, como nitrogênio limitado ou sem nitrogênio no meio de cultura. A limitação ou falta total de nitrogênio no meio de cultura estimula produção de óleo em alguns microorganismos como espécie de *Prototheca*, e pode ser utilizada como um gatilho para induzir produção de óleo em níveis elevados. Quando utilizado em combinação com os métodos de engenharia genética revelados aqui, o lipídeo como uma percentagem de peso de célula seca pode ser empurrado a níveis elevados como pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70% e pelo menos 75%; os métodos revelados aqui fornecem células com esses níveis de lipídeo, em que o lipídeo é pelo menos 4% C8-C14, pelo menos 0,3% C8, pelo menos 2% C10, pelo menos 2% C12, e pelo menos 2% C14. Em algumas modalidades, as células estão acima de 25% de lipídeos por peso de célula seca e contêm lipídeo que é pelo menos 10% C8-C14, pelo menos 20% C8-C14, pelo menos 30% C8-C14, 10-30% C8-C14, e 20-30% C8-C14,

[00203] Os óleos novos revelados aqui são distintos de outros óleos de ocorrência natural que são elevados em ácidos graxos de cadeia mic, como óleo de palma, óleo de semente de palma, e óleo de coco. Por exemplo, níveis de contaminantes como carotenóides são bem mais elevados em óleo de

palma e óleo de semente de palma do que nos óleos da invenção. Óleos de palma e semente de palma em particular contêm alfa e beta carotenos e licopeno em quantidades muito mais elevadas do que nos óleos da invenção. Além disso, mais de 20 carotenóides diferentes são encontrados em óleo de palma e semente de palma, ao passo que os exemplos demonstram que os óleos da invenção contêm muito poucas espécies de carotenóides e níveis muito baixos. Além disso, os níveis de compostos de vitamina E como tocotrienóis são bem mais elevados em óleo de palma, semente de palma, e coco do que nos óleos da invenção.

[00204] Em uma modalidade, a tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos de um ACP. Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa que catalisa a redução de uma CoA-acila graxa de 8 a 18 carbonos com 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 reductase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de uma CoA-acila graxa de 10 a 14 carbonos com o álcool primário correspondente, em que a tioesterase e a reductase 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 reductase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a redução de um CoA-acila graxa de 12 carbonos em dodecanol. Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica uma reductase de CoA-acila graxa que catalisa a redução de um CoA-acila graxa de 8 a 18 carbonos em um aldeído correspondente. Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica uma proteína portadora de acila que é naturalmente coexpressa com a tioesterase ACP-acila graxa.

[00205] Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica

uma reductase CoA-acila graxa, e o micróbio contém ainda um terceiro gene exógeno que codifica uma decarbonilase de aldeído graxo. Em alguns casos, a tioesterase codificada pelo primeiro gene exógeno catalisa a clivagem de um ácido graxo de 8 a 18 carbonos de um ACP, a reductase codificada pelo segundo gene exógeno catalisa a reductase de um CoA-acila graxa de 8 a 18 carbonos a um aldeído graxo correspondente, e a decarbonilase codificada pelo terceiro gene exógeno catalisa a conversão de um aldeído graxo de 8 a 18 carbonos com um alceno correspondente, em que a tioesterase, a reductase e a decarbonilase atuam no mesmo comprimento de cadeia de carbono.

[00206] Em algumas modalidades, o segundo gene exógeno codifica uma proteína portadora de acila, e o micróbio contém ainda um terceiro gene exógeno que codifica uma proteína selecionada do grupo que consiste em uma reductase CoA-acila graxa e uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa. Em alguns casos, o terceiro gene exógeno codifica uma reductase de CoA-acila graxa, e o micróbio contém ainda um quarto gene exógeno codificando uma decarbonilase de aldeído graxo.

[00207] A presente invenção também provê métodos para produzir um álcool que compreende cultivar uma população de células de *Prototheca* recombinantes em um meio de cultura, em que as células contêm (i) um primeiro gene exógeno que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa, e (ii) um segundo gene exógeno que codifica uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa, e as células sintetizam um ácido graxo ligado a uma proteína portadora de acila (ACP), a tioesterase ACP-acila graxa catalisa a clivagem do ácido graxo da ACP para fornecer, através de processamento adicional, uma CoA-acila graxa, e a reductase de aldeído/CoA – acila graxa catalisa a redução da CoA-acila graxa em um álcool.

[00208] A presente invenção também provê métodos de produzir uma molécula de lipídeo em uma célula de *Prototheca*. Em uma modalidade, o método compreende cultivar uma população de células de *Prototheca* em um



meio de cultura, em que as células contêm (i) um primeiro gene exógeno que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa, e (ii) um segundo gene exógeno que codifica uma reductase CoA-acila graxa, e em que os micróbios sintetizam um ácido graxo ligado a uma proteína portadora de acila (ACP), a tioesterase ACP-acila graxa catalisa a clivagem do ácido graxo da ACP para fornecer, através de processamento adicional, uma CoA-acila graxa, e a reductase de CoA-acila graxa catalisa a redução de CoA-acila em um aldeído.

[00209] A presente invenção também provê métodos de produzir uma molécula de ácido graxo tendo um comprimento de cadeia de carbono especificado em uma célula de *Prototheca*. Em uma modalidade, o método compreende cultivar uma população de células de *Prototheca* que produzem lipídeo em um meio de cultura, em que os micróbios contêm um gene exógeno que codifica uma tioesterase ACP-acila graxa tendo uma atividade específica ou preferencial para certo comprimento de cadeia de carbono, como 8, 10, 12 ou 14 átomos de carbono, e em que os micróbios sintetizam um ácido graxo ligado a uma proteína portadora de acila (ACP) e a tioesterase catalisa a clivagem do ácido graxo da ACP quando o ácido graxo foi sintetizado com o comprimento de cadeia de carbono específico.

[00210] Nas várias modalidades descritas acima, a célula de *Prototheca* pode conter pelo menos um gene exógeno que codifica uma enzima de via de lipídeo. Em alguns casos, a enzima de via de lipídeo é selecionada do grupo que consiste em uma desaturase ACP-estearoíla, uma desaturase de glicerolipídeo, um piruvato desidrogenase, uma carboxilase CoA-acetila, uma proteína portadora de acila, e um aciltransferase de fosfato glicerol-3. Em outros casos, a célula de *Prototheca* contém uma enzima de modificação de lipídeo selecionada do grupo que consiste em uma tioesterase ACP-acila graxa, uma reductase de aldeído/CoA-acila graxa, uma reductase de CoA-acila graxa, uma reductase de aldeído graxo, uma decarbonilase de aldeído graxo, e/ou uma proteína portadora de acila.

## **VI. PRODUÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS E COMBUSTÍVEIS**

[00211] Para a produção de combustível de acordo com os métodos da invenção, lipídeos produzidos por células da invenção são colhidos, ou de outro modo coletados, por qualquer meio conveniente. Lipídeos podem ser isolados por extração de células inteiras. As células são primeiramente rompidas, e então lipídeos associados à parede de célula/membrana de célula e intracelular bem como hidrocarbonetos extracelulares podem ser separados da massa de células, como por uso de centrifugação como descrito acima. Lipídeos intracelulares produzidos em microorganismos são, em algumas modalidades, extraídos após lisar as células dos microorganismos. Após extração, os lipídeos são adicionalmente refinados para produzir óleos, combustíveis ou oleoquímicos.

[00212] Após término de cultivo, os microorganismos podem ser separados do caldo de fermentação. Opcionalmente, a separação é efetuada por centrifugação para gerar uma pasta concentrada. A centrifugação não remove quantidades significativas de água intracelular a partir dos microorganismos e não é uma etapa de secagem. A biomassa pode ser então opcionalmente lavada com uma solução de lavagem (por exemplo, água DI) para se livrar do caldo de fermentação e resíduos. Opcionalmente, a biomassa microbiana lavada pode ser também seca (seca em forno, liofilizada, etc.) antes da ruptura das células. Alternativamente, as células podem ser lisadas sem separação de algum ou todo caldo de fermentação quando a fermentação é concluída. Por exemplo, as células podem estar em uma razão menor do que 1:1 v:v células para líquido extracelular quando as células são lisadas.

[00213] Microorganismos contendo um lipídeo podem ser lisados para produzir um lisado. Como detalhado aqui, a etapa de lisar um microorganismo (também mencionado como lise de célula) pode ser obtida por qualquer meio conveniente, incluindo lise induzido por calor, adição de

uma base, adição de um ácido, uso de enzimas como proteases e enzimas de degradação de polissacarídeo como amilases, uso de ultrassom, lise mecânica, uso de choque osmótico, infecção com um vírus lítico, e/ou expressão de um ou mais genes líticos. A lise é realizada para liberar moléculas intracelulares que foram produzidos pelo microorganismo. Cada desses métodos para lisar um microorganismo pode ser utilizado como um método único ou em combinação simultaneamente ou sequencialmente. A extensão de ruptura de células pode ser observada por análise microscópica. O uso de um ou mais dos métodos descritos aqui, tipicamente mais de 70% de quebra de células é observado. Preferivelmente, a quebra de células é maior do que 80%, mais preferivelmente maior do que 90% e mais preferivelmente aproximadamente 100%.

[00214] Em modalidades específicas, o microorganismo é lisado após crescimento, por exemplo, para aumentar a exposição de lipídeo e/ou hidrocarboneto celular para extração ou processamento adicional. O timing de expressão de lipase (por exemplo, através de um promotor induzível) ou lise de célula pode ser ajustado para otimizar o rendimento de lipídeos e/ou hidrocarbonetos. São descritas abaixo diversas técnicas de lise. Essas técnicas podem ser utilizadas individualmente ou em combinação.

[00215] Em uma modalidade da presente invenção, a etapa de lisar um microorganismo compreende aquecimento de uma suspensão celular contendo o microorganismo. Nessa modalidade, o caldo de fermentação contendo os microorganismos (ou uma suspensão de microorganismos isolados do caldo de fermentação) é aquecido até que os microorganismos, isto é, as paredes da célula e membranas de microorganismos degradam ou rompem. Tipicamente, as temperaturas aplicadas são pelo menos 50°C. 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 elevadas são

utilizadas para lise mais eficiente de células. Lise de células por tratamento térmico pode ser realizado por ferver o microorganismo. Alternativamente, o tratamento térmico (sem ebulição) pode ser realizado em uma autoclave. O lisado tratado com calor pode ser resfriado para tratamento adicional. A ruptura de células pode ser também realizada por tratamento a vapor, isto é, através de adição de vapor pressurizado. O tratamento a vapor de microalgas para ruptura de células é descrito, por exemplo, na patente US número 6,750,048, em algumas modalidades, o tratamento a vapor pode ser obtido por pulverizar vapor no fermentador e manter o caldo em uma temperatura desejada por menos do que aproximadamente 90 minutos, preferivelmente menos do que aproximadamente 60 minutos, e mais preferivelmente menos do que aproximadamente 30 minutos.

[00216] Em outra modalidade da presente invenção, a etapa de lisar um microorganismo compreende adicionar uma base a uma suspensão celular contendo o microorganismo. A base deve ser forte o bastante para hidrolisar pelo menos uma porção dos compostos proteínáceos dos microorganismos utilizados. Bases que são úteis para solubilizar proteínas são conhecidas na técnica de química. Bases exemplares que são úteis nos métodos da presente invenção incluem, porém não são limitadas a hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos de lítio, sódio, potássio, cálcio e misturas dos mesmos. Uma base preferida é KOH. O tratamento de base de microalgas para ruptura de células é descrito, por exemplo, na patente US número 6,750,048.

[00217] Em outra modalidade da presente invenção, a etapa de lisar um microorganismo compreende adicionar um ácido a uma suspensão celular contendo o microorganismo. Lise de ácido pode ser efetuada utilizando um ácido em uma concentração de 10 a 500 mN ou preferivelmente 40 a 160 nM. Lise de ácido é preferivelmente realizada acima da temperatura ambiente (por exemplo, em 40 a 160°C, e preferivelmente uma temperatura de 50 a 130°C. Para temperaturas moderadas (por exemplo, temperatura ambiente a 100°C e

particularmente temperatura ambiente a 65°C, tratamento ácido pode ser combinado de forma útil com sonicação ou outros métodos de ruptura de células.

[00218] Em outra modalidade da presente invenção, a etapa de lisar um microorganismo compreende lisar o microorganismo utilizando uma enzima. Enzimas preferidas para lisar um microorganismo são proteases e enzimas de degradar polissacarídeo 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).

[00219] Em outras modalidades da presente invenção, lise é realizada utilizando uma enzima como, por exemplo, uma celulase como uma enzima de degradar polissacarídeo, opcionalmente de *Chlorella* ou um vírus de *Chlorella* ou uma protease, como protease *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, Número 1, Janeiro de 2000 , pág. 29-32(4), Alcalase 2,4 FG (Novozymes), e Flavourzyme 100 L (Novozymes). Qualquer combinação de uma protease e uma enzima de degradar polissacarídeos pode ser também utilizada, incluindo qualquer combinação das proteases e enzimas de degradar polissacarídeo precedentes.

[00220] Em outra modalidade, lise pode ser realizada utilizando uma prensa expelidora. Nesse processo, biomassa é forçada através de um dispositivo do tipo parafuso em pressão elevada, lisando as células e fazendo com que o lipídeo intracelular seja liberado e separado da proteína e fibra (e outros componentes) na célula.

[00221] Em outra modalidade da presente invenção, a etapa de lisar um microorganismo é realizada utilizando ultrassom, isto é, sonicação. Desse modo, as células podem ser também lisadas com som de alta frequência. O som pode ser produzido eletronicamente e transportado através de uma ponta metálica para uma suspensão celular apropriadamente concentrada. Essa sonicação (ou ultrassonicação) rompe a integridade celular com base na criação de cavidades em suspensão de células.

[00222] Em outra modalidade da presente invenção, a etapa de lisar um microorganismo é realizada por lise mecânica. Células podem ser lisadas mecanicamente e opcionalmente homogeneizadas para facilitar coleta de hidrocarboneto (por exemplo, lipídeo). Por exemplo, um meio de ruptura de pressão pode ser utilizado para bombear uma pasta contendo células através de uma válvula de orifício restrito. Pressão elevada (até 1500 bar) é aplicada, seguido por uma expansão instantânea através de um bocal de saída. Ruptura de células é realizada por três mecanismos diferentes: incidência sobre a válvula, cisalhamento de líquido elevado no orifício, e quebra súbita de pressão após descarga, causando explosão da célula. O método libera moléculas intracelulares. Alternativamente, um moinho de bolas pode ser utilizado. Em um moinho de bolas, células são agitadas em suspensão com partículas abrasivas pequenas, como contas. As células quebram devido a forças de cisalhamento, trituração entre contas, e colisões com contas. As contas rompem as células para liberar o conteúdo celular. As células também podem ser rompidas por forças de cisalhamento, como com o uso de mistura (como com uma elevada velocidade ou misturador Waring como exemplos), a prensa francesa, ou mesmo centrifugação em caso de paredes de células fracas, para romper as células.

[00223] Em outra modalidade da presente invenção, a etapa de lisar um microorganismo é realizada por aplicar um choque osmótico.

[00224] Em outra modalidade, da presente invenção, a etapa de lisar

um microorganismo compreende infecção do microorganismo com um vírus lítico. Uma ampla variedade de vírus é conhecida para lisar microorganismos apropriados para uso na presente invenção, e a seleção e uso de um vírus lítico específico para um microorganismo específico está compreendido no nível de conhecimentos na técnica. Por exemplo, vírus *paramecium bursaria chlorella* (PBCV-1) é o protótipo de um grupo (família Phycodnaviridae, gênero Chlorovirus) de vírus de DNA de fita dupla, formação de placa, icosaedro, grandes que replicam em e lisam, certas algas verdes semelhantes a clorela, eucarióticas, unicelulares. Por conseguinte, quaisquer microalgas suscetíveis podem ser lisadas por infectar a cultura com um vírus de clorela apropriado. Os métodos de infectar espécies de *Chlorella* com um vírus de clorela são conhecidos. Vide, por exemplo, *Adv. Virus Res.* 2006;66:293-336; *Virology*, 25 de abril de 1999;257(1):15-23; *Virology*, 5 de janeiro de 2004;318(1):214-23; *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2000;(44):161-2; *J. Virol.* 2006 Mar;80(5):2437-44; e *Annu. Rev. Microbiol.* 1999;53:447-94,

[00225] Em outra modalidade da presente invenção, a etapa de lisar um microorganismo compreende autólise. Nessa modalidade, um microorganismo de acordo com a invenção é geneticamente construído para produzir uma proteína lítica que lisará o microorganismo. Esse gene lítico pode ser expresso utilizando um promotor induzível de modo que as células possam primeiramente ser cultivadas a uma densidade desejável em um fermentador, seguido por indução do promotor para expressar o gene lítico para lisar as células. Em uma modalidade, o gene lítico codifica uma enzima de degradar polissacarídeo. Em certas outras modalidades, o gene lítico é um gene de um vírus lítico. Desse modo, por exemplo, um gene lítico de um vírus *Chlorella* pode ser expresso em uma célula de algas; vide *Virology* 260, 308-315 (1999); *FEMS Microbiology Letters* 180 (1999) 45-53; *Virology* 263, 376-387 (1999); e *Virology* 230, 361-368 (1997). A expressão de genes líticos é feita preferivelmente utilizando um promotor induzível, como um

promoter ativo em microalgas que é induzido por um estímulo como a presença de uma pequena molécula, luz, calor e outros estímulos.

[00226] Vários métodos são disponíveis para separar lipídeos de lisados celulares produzidos pelos métodos acima. Por exemplo, lipídeos e derivados de lipídeos como aldeídos graxos, alcoóis graxos, e hidrocarbonetos como alcanos podem ser extraídos com um solvente hidrofóbico como hexano (vide Frfenz e outros 1989, *Enzyme Microb. Technol.*, 11:717). Lipídeos e derivados de lipídeos também podem ser extraídos utilizando liquefação (vide, por exemplo, Sawayama e outros. 1999, *Biomass and Bioenergy* 17:33-39 e Inoue e outros. 1993, *Biomass Bioenergy* 6(4):269-274); liquefação de óleo (vide, por exemplo, Minowa e outros. 1995, *Fuel* 74(12):1735-1738); e extração de CO<sub>2</sub> supercrítica (vide por exemplo, Mendes e outros. 2003, *Inorganica Chimica Acta* 356:328-334). Miao e Wu descrevem um protocolo da recuperação de lipídeo de microalgas de uma cultura de *Chlorella prototheocoides* na qual as células foram colhidas por centrifugação, lavadas com água destilada e secas por liofilização. O pó de células resultantes foi pulverizado em um pilão e então extraído com n –hexano. Miao e Wu, *Biosource Technology* (2006) 97:841 a 846.

[00227] Desse modo, lipídeos, derivados de lipídeo e hidrocarbonetos gerados pelos microorganismos da presente invenção podem ser recuperados por extração com um solvente orgânico. Em alguns casos, o solvente orgânico preferido é hexano. Tipicamente, o solvente orgânico é adicionado diretamente ao lisado sem separação anterior dos componentes de lisado. Em uma modalidade, o lisado gerado por um ou mais dos métodos descritos acima é contatado com um solvente orgânico por um período de tempo suficiente para permitir que os componentes de lipídeo e/ou hidrocarboneto formem uma solução com o solvente orgânico. Em alguns casos, a solução pode ser então adicionalmente refinada para recuperar componentes de lipídeo ou hidrocarboneto desejados, específicos. Métodos de extração de



hexano são bem conhecidos na técnica.

[00228] Lipídeos e derivados de lipídeos como aldeídos graxos, alcoóis graxos e hidrocarbonetos como alcanos produzidos pelas células como descrito aqui podem ser modificados pelo uso de uma ou mais enzimas, incluindo uma lipase, como descrito acima. Quando os hidrocarbonetos estão no ambiente extracelular das células, uma ou mais enzimas podem ser adicionadas àquele ambiente sob condições nas quais a enzima modifica o hidrocarboneto ou completa sua síntese de um precursor de hidrocarboneto. Alternativamente, os hidrocarbonetos podem ser parcial ou totalmente isolados do material celular antes da adição de um ou mais catalisadores como enzimas. Tais catalisadores são adicionados de forma exógena, e sua atividade ocorre fora da célula ou in vitro.

[00229] Desse modo, lipídeos e hidrocarbonetos produzidos por células in vivo, ou modificados enzimaticamente in vitro, como descrito aqui podem ser opcionalmente processados adicionalmente por meio convencional. O processamento pode incluir “craqueamento” para reduzir o tamanho, e desse modo aumentar a razão de hidrogênio:carbono, de moléculas de hidrocarboneto. Métodos de craqueamento térmico e catalítico são rotineiramente utilizados em processamento de óleo de triglicerídeo e hidrocarboneto. Métodos catalíticos envolvem o uso de um catalisador, como um catalisador de ácido sólido. O catalisador pode ser sílica-alumina ou uma zeólito, que resultam na quebra heterolítica ou assimétrica de uma ligação de carbono-carbono para resultar em um carbocátion e um ânion de hidreto. Esses intermediários reativos são então submetidos a rearranjo ou transferência de hidreto com outro hidrocarboneto. As reações podem desse modo regenerar os intermediários para resultar em um mecanismo de cadeia de auto-propagação. Hidrocarbonetos também podem ser processados para reduzir, opcionalmente a zero, o número de ligações duplas ou triplas de carbono-carbono nos mesmos. Hidrocarbonetos também podem ser

processados para remover ou eliminar um anel ou estrutura cíclica nos mesmos. Hidrocarbonetos também podem ser processados para aumentar a razão de hidrogênio:carbono. Isso pode incluir a adição de hidrogênio (“hidrogenação”) e/ou o “craqueamento” de hidrocarbonetos em hidrocarbonetos menores.

[00230] Métodos térmicos envolvem o uso de temperatura e pressão elevada para reduzir tamanho de hidrocarboneto. Uma temperatura elevada de aproximadamente 800°C e pressão de aproximadamente 700 kPa podem ser utilizadas. Essas condições geram “leve”, um termo que é às vezes utilizado para se referir a moléculas de hidrocarboneto ricas em hidrogênio (como distinguido de fluxo fóton) enquanto também gera, por condensação moléculas de hidrocarboneto mais pesadas que são relativamente esgotadas de hidrogênio. A metodologia provê quebra homolítica ou simétrica e produz alcenos, que pode ser opcionalmente enzimaticamente saturada como descrito acima.

[00231] Métodos catalítico e térmico são padrões em plantas para processamento de hidrocarboneto e refinação de óleo. Desse modo hidrocarbonetos produzidos por células como descrito aqui podem ser coletados e processados ou refinados através de meio convencional. Vide Hillen e outros (Biotechnology and Bioengineering., vol. XXIV: 193-205 (1982)) para um relatório sobre hidrocraqueamento de hidrocarbonetos produzidos de microalgas. Em modalidades alternativas, a fração é tratada com outro catalisador, como um composto orgânico, calor e/ou um composto inorgânico. Para processamento de lipídeos em biodiesel, um processo de transesterificação é utilizado como descrição na seção IV da presente invenção.

[00232] Hidrocarbonetos produzidos através de métodos da presente invenção são úteis em uma variedade de aplicações industriais. Por exemplo, a produção de sulfonato de alquil benzeno linear (LAS), um tensoativo

aniônico utilizado em quase todos os tipos de detergentes e preparados de limpeza, utiliza hidrocarbonetos compreendendo genericamente uma cadeia de 10-14 átomos de carbono. Vide, por exemplo, as patentes US números: 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. Tensoativos, como LAS, podem ser utilizados na fabricação de composições para cuidados pessoais e detergentes, como aqueles descritos nas patentes US números: 5.942.479; 6.086.903; 5.833.999; 6.468.955; e 6.407.044.

[00233] O interesse crescente é dirigido ao uso de componentes de hidrocarboneto de origem biológica em combustíveis, como biodiesel, diesel renovável, e combustível de jato, uma vez que materiais de partida biológicos renováveis que podem substituir materiais de partida derivados de combustíveis fósseis são disponíveis e o uso dos mesmos é desejável. Há necessidade urgente por métodos para produzir componentes de hidrocarboneto de materiais biológicos. A presente invenção atende essa necessidade por fornecer métodos para a produção de biodiesel, diesel renovável, e combustível de jato utilizando os lipídeos gerados pelos métodos descritos aqui como um material biológico para produzir biodiesel, diesel renovável e combustível de jato.

[00234] Combustíveis diesel tradicionais são destilados de petróleo ricos em hidrocarbonetos parafínicos têm faixas de ebulição tão amplas quanto 370° a 780°F, que são apropriadas pra combustão em um motor de ignição de compressão, como veículo de motor diesel. O American Society of Testing and Materials (ASTM) estabelece o tipo de diesel de acordo com a faixa de ebulição, juntamente com faixas permissíveis de outras propriedades do combustível, como número de cetano, ponto de névoa, ponto de inflamação, viscosidade, ponto de anilina, teor de enxofre, teor de água, teor de cinzas, corrosão de tira de cobre e resíduo de carbono. Tecnicamente, qualquer material destilado de hidrocarboneto derivado de biomassa ou de

outro modo que atenda à especificação ASTM apropriada pode ser definido como combustível diesel (ASTM D975), combustível de jato (ASTM D1655) ou como biodiesel se for um éster metílico de ácido graxo (ASTM D6751).

[00235] Após extração, componentes de lipídeo e/ou hidrocarboneto recuperados da biomassa microbiana descrita aqui podem ser submetidos a tratamento químico para fabricar um combustível para uso em veículos diesel e motores de jato.

[00236] Biodiesel é um líquido que varia em cor – entre dourado e marrom escuro – dependendo do insumo de produção. É praticamente imiscível com água, tem elevado ponto de ebulição e baixa pressão de vapor. Biodiesel se refere a um combustível processador equivalente a diesel para uso em veículos de motor diesel. Biodiesel é biodegradável e não tóxico. Um benefício adicional de biodiesel em relação a combustível diesel convencional é desgaste mais baixo do motor. Tipicamente, biodiesel compreende ésteres de alquila C14-C18. Vários processos convertem biomassa ou um lipídeo produzido e isolado como descrito aqui em combustíveis diesel. Um método preferido para produzir biodiesel é por transesterificação de um lipídeo como descrito aqui. Um éster de alquila preferido para uso como biodiesel é um éster de metila ou éster de etila.

[00237] Biodiesel produzido por um método descrito aqui pode ser utilizado individualmente ou misturado com combustível diesel convencional em qualquer concentração na maioria dos veículos de motor diesel modernos. Quando misturado com combustível diesel convencional (diesel de petróleo), biodiesel pode estar presente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 99,9%. Grande parte do mundo usa um sistema conhecido como o fator “B” para declarar a quantidade de biodiesel em qualquer mistura de combustível. Por exemplo, combustível contendo 20% de biodiesel é rotulado B20, Biodiesel puro é mencionado como B100.

[00238] Biodiesel também pode ser utilizado como um combustível de

aquecimento em boilers domésticos e comerciais. Boilers de óleo existentes podem conter partes de borracha e podem exigir conversão para operar em biodiesel. O processo de conversão é normalmente relativamente simples, envolvendo a troca de partes de borracha por partes sintéticas devido a biodiesel sendo um solvente forte. Devido a seu poder de solvente forte, a queima de biodiesel aumentará a eficiência de boilers. Biodiesel pode ser utilizado como aditivo em formulações de diesel para aumentar a lubrificação de combustível Diesel de enxofre ultra-baixo (ULSD) puro, que é vantajoso porque não tem virtualmente teor de enxofre. Biodiesel é um solvente melhor do que petrodiesel e pode ser utilizado para romper depósitos de resíduos nas linhas de combustível de veículos que rodavam previamente em petrodiesel.

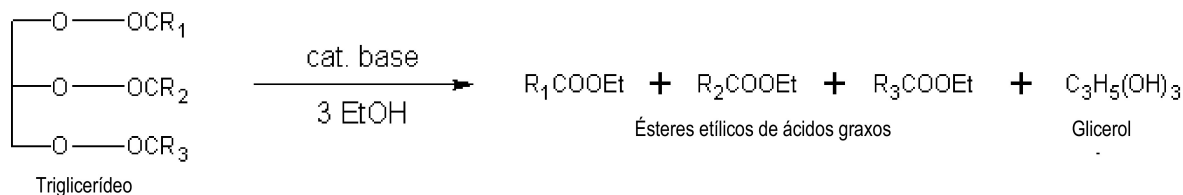
[00239] Biodiesel pode ser produzido por transesterificação de triglicerídeos contidos em biomassa rica em óleo. Desse modo, em outro aspecto da presente invenção um método para produzir biodiesel é fornecido. Em uma modalidade preferida, o método para produzir biodiesel compreende as etapas de (a) cultivar um microorganismo contendo lipídeo utilizando métodos revelados aqui (b) lisar um microorganismo contendo lipídeo para produzir um lisado, (c) isolar lipídeo do microorganismo lisado, e (d) transesterificar a composição de lipídeo, pelo que biodiesel é produzido. Os métodos para crescimento de um microorganismo, lisar um microorganismo para produzir um lisado, tratar o lisado em um meio compreendendo um solvente orgânico para formar uma mistura heterogênea e separar o lisado tratado em uma composição de lipídeo foram descritos acima e podem ser também utilizados no método de produzir biodiesel.

[00240] O perfil de lipídeo do biodiesel é normalmente altamente similar ao perfil de lipídeo do óleo de insumo. Outros óleos fornecidos pelos métodos e composições da invenção podem ser submetidos à transesterificação para fornecer biodiesel com perfis de lipídeo incluindo (a) pelo menos 4% de C8-C14; (b) pelo menos 0,3% de C8; (c) pelo menos 2%

de C10; (d) pelo menos 2% de C12; e (e) pelo menos 30% de C8-C14.

[00241] Composições de lipídeo podem ser submetidas à transesterificação para fornecer ésteres de ácido graxo de cadeia longa úteis como biodiesel. Reações de transesterificação preferidas são delineadas abaixo e incluem transesterificação de base catalisada e transesterificação utilizando lípases recombinantes. Em um processo de transesterificação de base catalisada, os triacilglicerídeos são reagidos com um álcool, como metanol ou etanol, na presença de um catalisador alcalino, tipicamente hidróxido de potássio. Essa reação forma ésteres de metila ou etila e glicerina (glicerol) como um subproduto.

[00242] Óleos de planta e animal são tipicamente feitos de triglicerídeos que são ésteres de ácidos graxos livres com o álcool triídrico, glicerol. Em transesterificação, o glicerol em um triacilglicerídeo (TAG) é substituído com um álcool de cadeia curta como metanol ou etanol. Um esquema de reação típica é como a seguir:



[00243] Nessa reação, o álcool é desprotonado com uma base para tornar o mesmo um nucleófilo mais forte. Comumente, etanol ou metanol é utilizado em vasto excesso (até 50 vezes). Normalmente, essa reação prosseguirá excessivamente lentamente ou não prosseguirá de forma alguma. Carlo, bem como um ácido ou base pode ser utilizado para ajudar a reação a prosseguir mais rapidamente. O ácido ou base não é consumido pela reação de transesterificação, desse modo não são reagentes, porém catalisadores. Quase todo biodiesel foi produzido utilizando a técnica de base catalisada visto que requer somente baixas temperaturas e pressões e produz mais de 98% de rendimento de conversão (com a condição de que o óleo de partida seja baixo

em umidade e ácidos graxos livres).

[00244] A transesterificação foi também realizada como discutido acima, utilizando uma enzima como lipase em vez de uma base. Transesterificação catalisada por liase pode ser realizada, por exemplo, em uma temperatura entre a temperatura ambiente e 80°C, e uma razão molar do TAG para o álcool inferior maior do que 1:1, preferivelmente aproximadamente 3:1, Lipases apropriadas para uso em transesterificação incluem, porém não são limitadas àquelas listas na Tabela 7. Outros exemplos de lipases úteis para transesterificação são encontradas, por exemplo, nas patentes US números 4,798,793; 4,940,845 5,156,963; 5,342,768; 5,776,741 e WO89/01032. Tais lipases incluem, porém não são limitadas a, lipases produzidas por microorganismos de *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor*, *Pseudomonas*, *Rhizomucor*, *Candida*, e *Humicola* e lipase de pâncreas.

Tabela 7. Lipases apropriadas para uso em transesterificação.

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

[00245] Um desafio para utilizar uma lipase para a produção de ésteres de ácido graxo apropriados para biodiesel é que o preço de lipase é muito mais elevado do que o preço de hidróxido de sódio (NaOH) utilizado pelo processo de base forte. Esse desafio foi tratado 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 que um processo baseado em lipase compita com o processo de base forte em termos do custo de produção. Lipases imobilizadas estão sujeitas a envenenamento pelos alcoóis inferiores tipicamente utilizados em transesterificação. A patente US número 6.398.707 (expedida em 4 de junho de 2002 para Wu e outros) descreve métodos para aumentar a atividade

de lipases imobilizadas e regenerar lipases imobilizadas tendo atividade reduzida. Alguns métodos apropriados incluem imergir uma lipase imobilizada em um álcool tendo um número de átomo de carbono não menor do que 3 por um período de tempo, preferivelmente de 0,5 a 48 horas, e mais preferivelmente de 0,5 a 1,5 horas. Alguns métodos apropriados também incluem lavar uma lipase imobilizada desativada com um álcool tendo um número de átomo de carbono não menor do que 3 e então imergir a lipase imobilizada desativada em um óleo vegetal por 0,5 a 48 horas.

[00246] Em modalidades específicas, uma lipase recombinante é expressa nos mesmos microorganismos que produzem o lipídeo no qual a lipase atua. Lipases recombinantes apropriadas incluem aquelas listadas acima na Tabela 7 e/ou tendo números de Acesso Genbank listados acima na tabela 7, ou um polipeptídeo que tem pelo menos 70% de identidade de aminoácidos com uma das listas listadas acima na tabela 7 e que apresenta atividade de lipase. Em modalidades adicionais, a atividade enzimática está presente em uma sequência que tem pelo menos aproximadamente 75%, pelo menos aproximadamente 80%, pelo menos aproximadamente 85%, pelo menos aproximadamente 90%, pelo menos aproximadamente 95%, ou pelo menos aproximadamente 99% de identidade com uma das sequências descritas acima, todas as quais são incorporadas pelo presente a título de referência como se exposta totalmente. DNA codificando a liase e marcador selecionável é preferivelmente cDNA otimizado por códon. Os métodos de recodificar genes para expressão em microalgas sapo descritos na patente US 7.135.290.

[00247] O padrão internacional comum para biodiesel é EN 14214, 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 requer conformidade com BS EN 14214. Testes industriais básicos para determinar se os produtos se conformam a esses padrões incluem tipicamente



cromatografia de gás, HPLC e outros. Biodiesel que atende aos padrões de qualidade é muito tóxico, com uma classificação de toxicidade ( $LD_{50}$ ) maior do que 50 mL/kg.

[00248] Embora biodiesel que atenda aos padrões ASTM tenha de ser não tóxico, pode haver contaminantes que tendem a cristalizar e/ou precipitar e sair da solução como sedimento. A formação de sedimentos é particularmente um problema quando biodiesel é utilizado em temperaturas mais baixas. O sedimento ou precipitados podem causar problemas como diminuir fluxo de combustível, obstruir linhas de combustível, obstruir filtros, etc. Processos são bem conhecidos na técnica que lidam especificamente com a remoção desses contaminantes e sedimentos em biodiesel para produzir um produto de qualidade superior. Os exemplos para tais processos incluem, porém não são limitados, a pré-tratamento do óleo para remover contaminantes como fosfolipídios e ácidos graxos livres (por exemplo, retirada de goma, refinação cáustica e filtração de adsorvente de sílica) e filtração fria. Filtração fria é um processo que foi desenvolvido especificamente para remover quaisquer materiais em partículas e sedimentos que estão presentes no biodiesel após produção. Esse processo resfria o biodiesel e filtra quaisquer sedimentos ou precipitados que poderiam se formar quando o combustível é utilizado em uma temperatura mais baixa. Tal processo é bem conhecido na arte e é descrito na publicação do pedido de patente US número 2007-0175091, Métodos apropriados podem incluir resfriamento do biodiesel a uma temperatura menor do que aproximadamente 38°C de modo que as impurezas e contaminantes precipitem para fora como materiais em partículas no líquido biodiesel. Terra diatomácea ou outro material de filtração pode ser então adicionado ao biodiesel resfriado para formar uma pasta, que pode ser então filtrada através de uma folha de pressão ou outro tipo de filtro para remover os materiais em partículas. O biodiesel filtrado pode ser então passado através de um filtro de polimento para

remover quaisquer sedimentos restantes e terra diatomácea, de modo a produzir o produto biodiesel final.

[00249] O Exemplo 14 descreveu a produção de biodiesel utilizando óleo de triglicerídeo de *Prototheca moriformis*. O método Capacidade de filtração de embeber frio pelo ASTM D6751 A1 do biodiesel produzido no exemplo 14 foi 120 segundos para um volume de 300 ml. Esse teste envolve filtração de 300 ml de B100, resfriado a 40°F por 16 horas, deixado aquecer até a temp. ambiente, e filtrado a vácuo utilizando filtro de fibra de vidro de 0,7 micron com suporte de aço inoxidável. Óleos da invenção podem ser transesterificados para gerar biodiesel com um tempo de embeber frio menor do que 120 segundos, menor do que 100 segundos e menor do que 90 segundos.

[00250] Processos subseqüentes também podem ser utilizados se o biodiesel for utilizado em temperaturas particularmente frias. Tais processos incluem adaptação para o inverno e fracionamento. Os dois processos são projetados para melhorar o desempenho em inverno e fluxo frio do combustível por diminuir o ponto de névoa (a temperatura na qual o biodiesel começa a cristalizar). Há várias abordagens para adaptação do biodiesel par o inverno. Uma abordagem é misturar o biodiesel com diesel de petróleo. Outra abordagem é utilizar aditivos que podem diminuir o ponto de névoa de biodiesel. Outra abordagem é remover ésteres de metila saturada indiscriminadamente por misturar aditivos e deixar a cristalização de saturados e então filtrar os cristais. O fracionamento separa seletivamente ésteres de metila em componentes ou frações individuais, permitindo a remoção ou inclusão de ésteres de metila específicos. Os métodos de fracionamento incluem fracionamento de uréia, fracionamento de solventes e destilação térmica.

[00251] Outro combustível valioso fornecido pelos métodos da presente invenção é diesel renovável, que compreende alcanos, como C10:0,

C12:0, C14:0, C16:0 e C18:0 e desse modo são distinguíveis de biodiesel. Diesel renovável de alta qualidade se conforma com o padrão ASTM D975, Os lipídeos produzidos pelos métodos da presente invenção podem servir como insumo para produzir diesel renovável. Desse modo, em outro aspecto da presente invenção, um método para produzir diesel renovável é fornecido. Diesel renovável pode ser produzido por pelo menos três processos: processamento hidrotérmico (hidrotratamento); hidroprocessamento e liquefação indireta. Esses processos fornecem destilados não de éster. Durante esses processos, triacilglicerídeos produzidos e isolados como descrito aqui, são convertidos em alcanos.

[00252] Em uma modalidade, o método para produzir diesel renovável compreende (a) cultivar um microorganismo contendo lipídeo utilizando métodos revelados aqui (b) lisar o microorganismo para produzir um lisado, (c) isolar lipídeo do microorganismo lisado, e (d) desoxigenar e hidrotratar o lipídeo para produzir um alcano, pelo que diesel renovável é produzido. Lipídeos apropriados para fabricar diesel renovável podem ser obtidos através de extração de biomassa microbiana utilizando um solvente orgânico como hexano, ou através de outros métodos como aqueles descritos na patente US 5.928.696. Alguns métodos apropriados podem incluir pressão mecânica e centrifugação.

[00253] Em alguns métodos, o lipídeo microbiano é primeiramente craqueado em combinação com hidrotratamento para reduzir comprimento de cadeia de carbono e saturar ligações duplas, respectivamente. O material é então isomerizado, também em combinação com hidrotratamento. A fração de nafta pode ser então removida através de destilação, seguido por destilação adicional para vaporizar e destilar componentes desejados no combustível diesel para atender um padrão ASTM D975 enquanto deixa componentes que são mais pesados do que desejado para atender o padrão D975. Os métodos de hidrotratamento, hidrocraqueamento, desoxigenação e isomerização de

modificar quimicamente óleos, incluindo óleos de triglicerídeo, são bem conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, os pedidos de patente européia 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.

[00254] Em uma modalidade do método para produzir diesel renovável, o tratamento do lipídeo para produzir um alceno é executado por hidrotratamento da composição de lipídeo. No processamento hidrotérmico, tipicamente, biomassa é reagida em água em uma temperatura e pressão elevadas para formar óleos e sólidos residuais. Temperaturas de conversão são tipicamente 300° a 660°F, com pressão suficiente para manter a água principalmente como um líquido, 100 a 170 atmosfera padrão (atm). Tempos de reação são da ordem de 15 a 30 minutos. Após término da reação, os orgânicos são separados da água. Desse modo um destilado apropriado para diesel é produzido.

[00255] Em alguns métodos de fazer diesel renovável, a primeira etapa de tratar um triglicerídeo é hidrocessamento para saturar ligações duplas, seguido por desoxigenação em temperatura elevada na presença de hidrogênio e um catalisador. Em alguns métodos, hidrogenação e desoxigenação ocorrem na mesma reação. Em outros métodos desoxigenação ocorre antes da hidrogenação. Isomerização é então opcionalmente realizada, também na presença de hidrogênio e um catalisador. Componentes de nafta são preferivelmente removidos através de destilação. Por exemplo, vide 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).

[00256] Um método apropriado para a hidrogenação de triglicerídeos inclui a preparação de uma solução aquosa de sais de cobre, zinco, magnésio e lantânio e outra solução de metal alcalino ou preferivelmente carbonato de

amônio. As duas soluções podem ser aquecidas a uma temperatura de aproximadamente 20°C até aproximadamente 85°C e dosadas juntas em um recipiente de precipitação em taxas de tal modo que o pH no recipiente de precipitação seja mantido entre 5,5 e 7,5 para formar um catalisador. Água adicional pode ser utilizada inicialmente no recipiente de precipitação ou adicionada simultaneamente com a solução de sal e solução de precipitação. O precipitado resultante pode ser então completamente lavado, seco, calcinado a aproximadamente 300°C e ativado em hidrogênio em temperaturas que variam de aproximadamente 100°C a aproximadamente 400°C. Um ou mais triglicerídeos podem ser então contatados e reagidos com hidrogênio na presença do catalisador descrito acima em um reator. O reator pode ser um reator de leito de acumulação, reator sólido-gás de leito fixo, reator de coluna de bolha acondicionada, reator de tanque continuamente agitado, um reator de fase de pasta, ou qualquer outro tipo de reator apropriado conhecido na técnica. O processo pode ser realizado em batelada ou em modo contínuo. Temperaturas de reação estão tipicamente na faixa de aproximadamente 170°C a aproximadamente 250°C enquanto as pressões de reação estão tipicamente na faixa de aproximadamente 300 psig a aproximadamente 2000 psig. Além disso, a razão molar de hidrogênio para triglicerídeo no processo da presente invenção está tipicamente na faixa de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 700:1. O processo é tipicamente realizado em uma velocidade espacial horária ponderal (WHSV) na faixa de aproximadamente 0,1 h<sup>-1</sup> a aproximadamente 5 h<sup>-1</sup>. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que o período de tempo exigido para reação variará de acordo com a temperatura utilizada, a razão molar de hidrogênio para triglicerídeo, e a pressão parcial de hidrogênio. Os produtos produzidos pelos processos de hidrogenação incluem alcoóis graxos, glicerol, resíduos de parafinas e triglicerídeos não reagidos. Esses produtos são tipicamente separados por meio convencional como, por exemplo, destilação, extração,

filtração, cristalização e similares.

[00257] Refinadores de petróleo utilizam hidrocessamento para remover impurezas por tratar alimentações com hidrogênio. Temperaturas de conversão de hidrocessamento são tipicamente 300° a 700°F. Pressões são tipicamente 40 a 100 atm. Os tempos de reação são tipicamente da ordem de 10 a 60 minutos. Catalisadores sólidos são empregados para aumentar certas taxas de reação, melhorar a seletividade para certos produtos, e otimizar consumo de hidrogênio.

[00258] Métodos apropriados para a desoxigenação de um óleo incluem aquecer um óleo a uma temperatura na faixa de aproximadamente 350°F a aproximadamente 550°F e continuamente contatar o óleo aquecido com nitrogênio sob pelo menos pressão que varia de aproximadamente atmosférica até acima por pelo menos aproximadamente 5 minutos.

[00259] Métodos apropriados para isomerização incluem o uso de isomerização alcalina e outra isomerização de óleo conhecida na técnica.

[00260] Hidrotratamento e hidrocessamento levam finalmente a uma redução no peso molecular da alimentação de triglicerídeo. A molécula de triglicerídeo é reduzida a quatro moléculas de hidrocarboneto sob condições de hidrocessamento: uma molécula de propano e três moléculas de hidrocarboneto mais pesadas, tipicamente na faixa de C8 a C18.

[00261] Desse modo, em uma modalidade, o produto de uma ou mais reação(ões) química(s) realizada(s) em composições de lipídeo da invenção é uma mistura de alceno que compreende diesel renovável ASTM D975. A produção de hidrocarbonetos por microorganismos é examinada por Metzger e outros. Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66: 486–496 e 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 e Paul Roessler (1998).

[00262] As propriedades de destilação de um combustível diesel são

descritas em termos de T10-T90 (temperatura a 10% e 90% respectivamente, volume destilado). Diesel renovável foi produzido de óleo de triglicerídeo *Prototheca moriformis* e é descrito no exemplo 14. O T10-T90 do material produzido no exemplo 14 foi de 57,9°C. os métodos de hidrotratamento, isomerização e outra modificação covalente de óleos revelados aqui, bem como métodos de destilação e fracionamento (como filtração fria) revelados aqui, podem ser empregados para gerar composições de diesel renovável com outras faixas T10-T90, como 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 e 65°C utilizando óleos de triglicerídeo produzidos de acordo com os métodos revelados aqui.

[00263] O T10 do material produzido no Exemplo 14 foi de 242,1°C. Os métodos de hidrotratamento, isomerização e outra modificação covalente de óleos revelados aqui, bem como métodos de destilação e fracionamento (como filtração fria) revelados aqui, podem ser empregados para gerar composições de diesel renovável com outros valores T10, como T10 entre 180 e 295, entre 190 e 270, entre 210 e 250, entre 225 e 245, e pelo menos 290.

[00264] O T90 do material produzido no Exemplo 14 foi de 300°C. os métodos de hidrotratamento, isomerização e outra modificação covalente de óleos revelados aqui, bem como métodos de destilação e fracionamento (como filtração fria) revelados aqui podem ser empregados para gerar composições de diesel renovável com outros valores T90, como T90 entre 280 e 380, entre 290 e 360, entre 300 e 350, entre 310 e 340 e pelo menos 290.

[00265] O FBP do material produzido no Exemplo 14 foi de 300°C. Os métodos de hidrotratamento, isomerização e outra modificação covalente de óleos revelados aqui, bem como métodos de destilação e fracionamento (como filtração fria) revelados aqui, podem ser empregados para gerar composições de diesel renovável com outros valores FBP, como FBP entre 290 e 400, entre 300 e 385, entre 310 e 370, entre 315 e 360, e pelo

menos 300.

[00266] Outros óleos fornecidos pelos métodos e composições da invenção podem ser submetidos a combinações de hidrotratamento, isomerização, e outra modificação covalente incluindo óleos com perfis de lipídeo incluindo (a) pelo menos 4% C8-C14; (b) pelo menos 0,3% C8; (c) pelo menos 2% C10; (d) pelo menos 2% C12; e (3) pelo menos 30% C8-C14.

[00267] Um diesel de enxofre ultrabaixo tradicional pode ser produzido de qualquer forma de biomassa por um processo de duas etapas. Primeiramente, a biomassa é convertida em um gás de síntese, uma mistura gasosa rica em hidrogênio e monóxido de carbono. A seguir, o gás de síntese é cataliticamente convertido em líquidos. Tipicamente, a produção de líquidos é realizada utilizando síntese Fischer-Tropsch (FT). Essa tecnologia se aplica a carvão, gás natural e óleos pesados. Desse modo, ainda em outra modalidade preferida do método para produzir diesel renovável, o tratamento da composição de lipídeo para produzir um alcano é realizado por liquefação indireta da composição de lipídeo.

[00268] A presente invenção também provê métodos para produzir combustível de jato. Combustível de jato é de cor clara para palha. O combustível mais comum é um combustível a base de óleo de parafinas/sem chumbo classificado como Aeroplane A-1, que é produzido para um conjunto internacionalmente padronizado de especificações. Combustível de jato é uma mistura de um grande número de hidrocarbonetos diferentes, possivelmente tantos quantos um mil ou mais. A faixa de seus tamanhos (pesos moleculares ou números de carbono) é limitada pelas exigências para o produto, por exemplo, ponto de congelamento ou ponto máximo de chama sem fumaça. Combustível de Aeroplane do tipo querosene (incluindo Jato A e Jato A-1) tem uma distribuição de número de carbono entre aproximadamente 8 e 16 números de carbono. Combustível Aeroplane do tipo nafta ou corte amplo (incluindo Jato B) tem tipicamente uma distribuição de número de carbono



entre aproximadamente 5 e 15 carbonos.

[00269] Ambos Aeroplanes (Jato A e Jato B) podem conter diversos aditivos. Aditivos úteis incluem, porém não são limitados a antioxidantes, agentes antiestáticos, inibidores de corrosão, e agentes inibidores de formação de gelo de sistema de combustível (FSII). Antioxidantes evitam goma e normalmente são baseados em fenóis alquilados, por exemplo, AO-30, AO-31 ou AO-37. Agentes antiestáticos dissipam eletricidade estática e evitam centelhamento. Stadis 450 com ácido dinonil naftil sulfônico (DINNSA) como o ingrediente ativo, é um exemplo. Inibidores de corrosão, por exemplo, DCI-4A é utilizado para combustíveis militares e civis e DCI-6A é utilizado para combustíveis militares. Agentes FSII incluem, por exemplo, Di-EGME.

[00270] Em uma modalidade da invenção, um combustível de jato é produzido por misturar combustíveis de alga com combustível de jato existente. Os lipídeos produzidos pelos métodos da presente invenção podem servir como insumo para produzir combustível de jato. Desse modo, em outro aspecto da presente invenção, um método para produzir combustível de jato é fornecido. Com o presente dois métodos para produzir combustível de jato dos lipídeos produzidos pelos métodos da presente invenção são fornecidos: craqueamento catalítico de fluido (FCC); e hidrodesoxigenação (HDO).

[00271] Craqueamento catalítico de fluido (FCC) é um método que é utilizado para produzir olefinas, especialmente propileno de frações brutas pesadas. Os lipídeos produzidos pelo método da presente invenção podem ser convertidos em olefinas. O processo envolve fluir os lipídeos produzidos através de uma zona FCC e coletar um fluxo de produto compreendido de olefinas, que é útil como combustível de jato. Os lipídeos produzidos são contatados com um catalisador de craqueamento em condições de craqueamento para fornecer um fluxo de produto que compreende olefinas e hidrocarbonetos úteis como combustível de jato.

[00272] Em uma modalidade, o método para produzir combustível de

jato compreende (a) cultivar um microorganismo contendo lipídeo utilizando métodos revelados aqui, (b) lisar o microorganismo contendo lipídeo para produzir um lisado, (c) isolar lipídeo do lisado, e (d) tratar a composição de lipídeo, pelo que combustível de jato é produzido. Em uma modalidade do método para produzir um combustível de jato, a composição de lipídeo pode ser fluída através de uma zona de craqueamento catalítico de fluido, que, em uma modalidade, pode compreender contatar a composição de lipídeo com um catalisador de craqueamento em condições de craqueamento para fornecer um fluxo de produto compreendendo olefinas  $C_2$ - $C_5$ .

[00273] Em certas modalidades desse método, pode ser desejável remover quaisquer contaminantes que podem estar presentes na composição de lipídeo. Desse modo, antes de fluir a composição de lipídeo através de uma zona de craqueamento catalítico de fluido, a composição de lipídeo é pré-tratada. O pré-tratamento pode envolver contatar a composição de lipídeo com uma resina de permuta de íons. A resina de permuta de íons é uma resina de permuta de íon ácido, como Amberlyst™-15 e pode ser utilizada como um leito em um reator através do qual a composição de lipídeo é fluída, fluxo ascendente ou fluxo descendente. Outros pré-tratamentos podem incluir lavagens com ácido branco por contatar a composição de lipídeo com um ácido, como ácido sulfúrico, acético, nítrico ou clorídrico. O contato é feito com uma solução de ácido diluída normalmente em temperatura ambiente e pressão atmosférica.

[00274] A composição de lipídeo, opcionalmente pré-tratada, é fluída até uma zona FCC onde os componentes hidrocarbonáceos são craqueados em olefinas. O craqueamento catalítico é realizado por contatar a composição de lipídeo em uma zona de reação com um catalisador composto de material em partículas finamente dividido. A reação é craqueamento catalítico, ao contrário de hidrocraqueamento, e é realizada na ausência de hidrogênio adicionado ou o consumo de hidrogênio. À medida que a reação de

craqueamento prossegue, quantidades substanciais de coque são depositadas no catalisador. O catalisador é regenerado em temperaturas elevadas por queimar coque do catalisador em uma zona de regeneração. Catalisador contendo coque, mencionado aqui como catalisador coqueificado, é continuamente transportado da zona de reação para a zona de regeneração para ser regenerado e substituído por catalisador regenerado essencialmente isento de coque a partir da zona de regeneração. A fluidificação das partículas de catalisador por vários fluxos gasosos permite o transporte de catalisador entre a zona de reação e a zona de regeneração. Os métodos para craquear hidrocarbonetos, como aqueles da composição de lipídeo descrita aqui, em um fluxo fluidificado de catalisador, transportando catalisador entre zonas de reação e regeneração, e queimando coque no regenerador são bem conhecidos por aqueles versados na técnica de processos FCC. Aplicações de FCC exemplares e catalisadores úteis para craqueamento da composição de lipídeo para produzir olefinas  $C_2$ - $C_5$  são descritas nas patentes US números 6.538.169, 7.288.685, que são incorporadas na íntegra a título de referência.

[00275] Catalisadores de FCC apropriados compreendem genericamente pelo menos dois componentes que podem ou não estar na mesma matriz. Em algumas modalidades, os dois componentes podem ser circulados por todo recipiente de reação. O primeiro competente inclui genericamente quaisquer dos catalisadores bem conhecidos que são utilizados na técnica de craqueamento catalítico fluidificado, como um catalisador do tipo argila amorfa ativa e/ou uma peneira molecular cristalina, de atividade elevada. Catalisadores de peneira molecular podem ser preferidos em relação a catalisadores amorfos devido a sua seletividade muito aperfeiçoada para produtos desejados. Em algumas modalidades preferidas, zeólitos podem ser utilizados como a peneira molecular nos processos FCC. Preferivelmente, o primeiro componente de catalisador compreende um zeólito de poro grande, como um zeólito do tipo Y, um material de alumina ativa, um material

aglutinante, compreendendo sílica ou alumina e uma carga inerte como caulim.

[00276] Em uma modalidade, craqueamento da composição de lipídeo da presente invenção, ocorre na seção de tubo ascendente, ou alternativamente, na seção de elevação, da zona FCC. A composição de lipídeo é introduzida no tubo ascendente por um bocal resultando na vaporização rápida da composição de lipídeos. Antes de contatar o catalisador, a composição de lipídeos terá comumente uma temperatura de aproximadamente 149°C a aproximadamente 316°C (300°F a 600°F). O catalisador é fluído de um recipiente de mistura para o tubo ascendente onde contata a composição de lipídeo por um tempo de aproximadamente 2 segundos ou menos.

[00277] O catalisador misturado e vapores de composição de lipídeo reagido são então despregados do topo do tubo ascendente através de uma saída e separados em um fluxo de vapor de produto craqueado incluindo olefinas e uma coleção de partículas de catalisador cobertas com quantidades substanciais de coque e genericamente mencionadas como “catalisador coqueificado.” Em um esforço para minimizar o tempo de contato da composição de lipídeo e catalisador que pode promover conversão adicional de produtos desejados em outros produtos indesejáveis, qualquer arranjo de separadores como um arranjo de braço de oscilação pode ser utilizado para remover catalisador coqueificado do fluxo de produto rapidamente. O separador, por exemplo, separador de braço de oscilação, é localizado em uma porção superior de uma câmara com uma zona de extração situada na porção inferior da câmara. O catalisador separado pelo arranjo de braço de oscilação cai para dentro da zona de extração. O fluxo de vapor de produto craqueado compreendendo hidrocarbonetos craqueados, incluindo olefinas leves e algum catalisador, sai da câmara através de um conduto que está em comunicação com ciclones. Os ciclones removem partículas de catalisador restantes a partir

do fluxo de vapor de produto para reduzir concentrações de partículas a níveis muito baixos. O fluxo de vapor de produto então sai do topo do recipiente de separação. O catalisador separado pelos ciclones é retornado ao recipiente de separação e então para a zona de extração. A zona de extração remove hidrocarbonetos adsorvidos a partir da superfície do catalisador por contato contracorrente com vapor.

[00278] A pressão baixa parcial de hidrocarboneto opera para favorecer a produção de olefinas leves. Por conseguinte, a pressão de tubo ascendente é ajustada em aproximadamente 172 a 241 kPa (25 a 35 psia) com uma pressão parcial de hidrocarboneto de aproximadamente 35 a 172 kPa (5 a 25 psia), com uma pressão parcial de hidrocarboneto preferida de aproximadamente 69 a 138 kPa (10 a 20 psia). Essa pressão parcial relativamente baixa de hidrocarboneto é obtida utilizando vapor como diluente até o ponto em que o diluente é 10 a 55% em peso de composição de lipídeo e preferivelmente aproximadamente 15% em peso de composição de lipídeo. Outros diluentes como gás seco podem ser utilizados para obter pressões parciais de hidrocarboneto equivalentes.

[00279] A temperatura do fluxo craqueado na saída do tubo ascendente será aproximadamente 510°C a 621°C (950°F a 1150°F). Entretanto, as temperaturas de saída de tubo ascendente acima de 566°C (1050°F) fazem mais gás seco e mais olefinas. Ao passo que as temperaturas de saída do tubo ascendente abaixo de 566°C (1050°F) fazem menos etileno e propileno. Por conseguinte, prefere-se operar o processo FCC em uma temperatura preferida de aproximadamente 566°C a aproximadamente 630°C, pressão preferida de aproximadamente 138 kPa a aproximadamente 240 kPa (20 a 35 psia). Outra condição para o processo é a razão de composição de catalisador para lipídeo que pode variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 e preferivelmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 15. [0285] Em uma modalidade do método para produzir um combustível de jato, a

composição de lipídeo é introduzida na seção de elevação de um reator FCC. A temperatura na seção de elevação será muito quente e varia de aproximadamente 700°C (1292°F) a aproximadamente 760°C (1400°F) com uma razão de composição de catalisador para lipídeo de aproximadamente 100 a aproximadamente 150. Prevê-se que a introdução da composição de lipídeo na seção de elevação produzirá quantidades consideráveis de propileno e etileno.

[00280] Em outra modalidade do método para produzir um combustível de jato utilizando a composição de lipídeo ou os lipídeos produzidos como descrito aqui, a estrutura da composição de lipídeo ou os lipídeos é quebrada por um processo mencionado como hidrodessoxigenação (HDO). HDO significa remoção de oxigênio por intermédio de hidrogênio, isto é, oxigênio é removido enquanto quebra a estrutura do material. Ligações duplas olefínicas são hidrogenadas e quaisquer compostos de enxofre e nitrogênio são removidos. A remoção de enxofre é chamada hidrodessulfurização (HDS). O pré-tratamento e pureza das matérias primas (composição de lipídeo ou os lipídeos) contribuem para a vida em serviço do catalisador.

[00281] Genericamente na etapa de HDO/HDS, hidrogênio é misturado com o insumo (composição de lipídeo ou os lipídeos) e então a mistura é passada através de um leito catalisador como um fluxo co-corrente, como um estoque de alimentação de fase única ou duas fases. Após a etapa HDO/HDS, a fração de produto é separada e passada para um reator de isomerização separado. Um reator de isomerização para material de partida biológico é descrito na literatura (F1 100 248) como um reator cocorrente.

[00282] O processo para produzir um combustível por hidrogenar uma alimentação de hidrocarboneto, por exemplo, a composição de lipídeo ou os lipídeos da presente invenção, também pode ser realizado por passar a composição de lipídeo ou os lipídeos como um fluxo de co-corrente com gás

hidrogênio através de uma primeira zona de hidrogenação, e posteriormente o efluente de hidrocarboneto é adicionalmente hidrogenado em uma segunda zona de hidrogenação por passar gás hidrogênio para a segunda zona de hidrogenação como um fluxo contracorrente em relação ao efluente de hidrocarboneto. Aplicações de HDO exemplares e catalisadores úteis para craquear a composição de lipídeo para produzir olefinas C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> são descritos na patente US número 7.232.935, que é incorporada na íntegra a título de referência.

[00283] Tipicamente, na etapa de hidrodesoxigenação, a estrutura do componente biológico, como a composição de lipídeo ou lipídeos da presente invenção, 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, isto é, na etapa denominada isomerização, isomerização é realizada para ramificar a cadeia de hidrocarboneto e melhorar o desempenho da parafina em baixas temperaturas.

[00284] Na primeira etapa, isto é, etapa HDO, do processo de craqueamento, gás hidrogênio e a composição de lipídeo ou lipídeos da presente invenção que devem ser hidrogenados são passados para um sistema de leito catalisador HDO como fluxos co-corrente ou contracorrente, o sistema de leito catalisador compreendendo um ou mais leito(s) catalisador(es), preferivelmente 1-3 leitos catalisadores. A etapa HDO é tipicamente operada em um modo cocorrente. No caso de um sistema de leito catalisador HDO compreendendo dois ou mais leitos de catalisador, um ou mais dos leitos pode ser operado utilizando o princípio de fluxo contracorrente. Na etapa HDO, a pressão varia entre 20 e 150 bar, preferivelmente entre 50 e 100 bar, e a temperatura varia entre 200 e 500°C, preferivelmente na faixa de 300-400°C. Na etapa HDO, catalisadores de hidrogenação conhecidos contendo metais do Grupo VII e/ou VIB do Sistema periódico podem ser utilizados. Preferivelmente, os catalisadores de

hidrogenação são catalisadores Pd, Pt, Ni, NiMo ou CoMo suportados, o suporte sendo alumina e/ou sílica. Tipicamente, catalisadores NiMo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e CoMo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são utilizados.

[00285] Antes da etapa HDO, a composição de lipídeo ou lipídeos da presente invenção podem ser tratados opcionalmente por prehidrogenação sob condições mais brandas desse modo evitando reações colaterais das ligações duplas. Tal pré-hidrogenação é realizada na presença de um catalisador de prehidrogenação em temperaturas de 50 a 400°C e em pressões de hidrogênio de 1 200 bar, preferivelmente em uma temperatura entre 150 e 250°C e em 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 pré-hidrogenação é um catalisador Pd, Pt, Ni, NiMo ou CoMo suportado, o suporte sendo alumina e/ou sílica.

[00286] Um fluxo gasoso da etapa HDO contendo hidrogênio é resfriado e então compostos de monóxido de carbono, dióxido de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, hidrocarbonetos leves gasosos e outras impurezas são removidos do mesmo. Após compressão, o hidrogênio purificado ou hidrogênio reciclado é retornado ao primeiro leito de catalisador e/ou entre os leitos de catalisador para compensar pelo fluxo de gás resfriado. Água é removida do líquido condensado. O líquido é passado para o primeiro leito de catalisador ou entre os leitos de catalisador.

[00287] Após a etapa HDO, o produto é submetido a uma etapa de isomerização. É substancial para o processo que as impurezas sejam removidas tão completamente quanto possível antes que os hidrocarbonetos sejam contatados com o catalisador de isomerização. A etapa de isomerização compreende uma etapa de extração opcional, em que o produto de reação da etapa HDO pode ser purificado por extração com vapor de água ou um gás apropriado como hidrocarboneto leve, nitrogênio ou hidrogênio. A etapa de extração opcional é realizada em modo contracorrente em uma unidade à



montante do catalisador de isomerização, em que o gás e líquido são contatados entre si ou antes do reator de isomerização efetivo em uma unidade de extração separada utilizando princípio de contracorrente.

[00288] Após a etapa de extração o gás hidrogênio e a composição de lipídeo hidrogenado ou lipídeos da presente invenção, e opcionalmente uma mistura de n-parafina, são passados para uma unidade de isomerização reativa compreendendo um ou vários leito(s) de catalisador. Os leitos de catalisador da etapa de isomerização podem operar em modo cocorrente ou contracorrente.

[00289] É importante para o processo que o princípio de fluxo contracorrente seja aplicado na etapa de isomerização. Na etapa d isomerização isso é feito por realizar a etapa de extração opcional ou a etapa de reação de isomerização ou ambos no modo contracorrente. Na etapa de isomerização, a pressão varia na faixa de 20 150 bar, preferivelmente na faixa de 20 100 bar, a temperatura estando entre 200 e 500°C, preferivelmente entre 300 e 400°C. na etapa de isomerização, catalisadores de isomerização conhecidos na técnica podem ser utilizados. Catalisadores de isomerização apropriados contêm peneira molecular e/ou um metal do Grupo VII ZSM-22 ou ZSM-23 ou ferrierita e Pt, Pd ou Ni e  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ou  $\text{SiO}_2$ . Catalisadores de isomerização típicos são, por exemplo, Pt/SAPO-11/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Pt/ZSM-22/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Pt/ZSM-23/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  e Pt/SAPO-11/ $\text{SiO}_2$ . A etapa de isomerização e a etapa HDO podem ser realizadas no mesmo recipiente de pressão ou em recipiente de pressão separados. A prehidrogenação opcional pode ser realizada em um recipiente de pressão separado ou no mesmo recipiente de pressão que as etapas de isomerização e HDO.

[00290] Desse modo, em uma modalidade, o produto de uma ou mais reações químicas é uma mistura de alcano que compreende combustível de jato ASTM D1655. Em algumas modalidades, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem um teor de enxofre

que é menor do que 10 ppm. Em outras modalidades, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem um valor T10 da curva de destilação menor do que 205°C. Em outra modalidade, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem um ponto de ebulição final (FBP) menor do que 300°C. Em outra modalidade, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem um ponto de inflamação de pelo menos 38°C. Em outra modalidade, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem uma densidade entre 775K/M<sup>3</sup> e 840K/M<sup>3</sup>. Ainda em outra modalidade, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem um ponto de congelamento que está abaixo de -47°C. Em outra modalidade, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem um Calor de combustão líquido que é pelo menos 42,8 MJ/K. Em outra modalidade, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem um teor de hidrogênio que é pelo menos 13,4% em massa. Em outra modalidade, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem uma estabilidade térmica, como testado por JFTOT gravimétrico quantitativo a 260°C, que é abaixo de 3 mm de Hg. Em outra modalidade, a composição que se conforma à especificação de combustível de jato ASTM 1655 tem uma bomba existente que está abaixo de 7 mg/dl.

[00291] Desse modo, a presente invenção revela uma variedade de métodos nos quais a modificação química de lipídeo de microalgas é realizada para fornecer produtos úteis em uma variedade de aplicações industriais e outras. Os exemplos de processos para modificar óleo produzido pelos métodos revelados aqui incluem, porém não são limitados a, hidrólise do óleo, hidroprocessamento do óleo, e esterificação do óleo. A modificação do óleo de microalgas produz oleoquímicos básicos que podem ser adicionalmente modificados em oleoquímicos derivados selecionados para uma função

desejada. Em um modo similar àquele descrito acima com referência a processos de produção de combustível, essas modificações químicas também podem ser realizadas em óleos gerados das culturas microbianas descritas aqui. Os exemplos de oleoquímicos básicos incluem, porém não são limitados a sabões, ácidos graxos, ésteres metílicos de ácido graxo, e glicerol. Os exemplos de oleoquímicos derivados incluem, porém não são limitados a nitrilas graxas, ésteres, ácidos de dímero, quats, tensoativos, alcanolamidas graxas, sulfatos de álcool graxo, resinas, emulsificantes, alcoóis graxos, olefinas e alcanos mais elevados.

[00292] Hidrólise dos constituintes de ácido graxo a partir dos glicerolipídeos produzidos pelos métodos da invenção fornece ácidos graxos livres que podem ser derivados para produzir outros produtos químicos úteis. Hidrólise ocorre na presença de água e um catalisador que pode ser um ácido ou uma base. Os ácidos graxos livres liberados podem ser derivados para fornecer uma variedade de produtos, como relatado nos que se seguem:

[00293] Patentes US Nos. 5.304.664 (Highly sulfated ácido graxos); 7.262.158 (Cleansing compositions); 7.115.173 (Fabric softener compositions); 6.342.208 (Emulsions for treating skin); 7.264.886 (Water repellant compositions); 6.924.333 (Paint additives); 6.596.768 (Lipid-enriched ruminant feedstock); e 6.380.410 (Surfactants for detergents and cleaners).

[00294] Com relação à hidrólise, em uma modalidade da invenção, um óleo de triglicerídeo é opcionalmente hidrolisado primeiramente em um meio líquido como água ou hidróxido de sódio de modo a obter glicerol e sabões. Há vários métodos de hidrólise de triglicerídeo apropriados, incluindo, porém não limitados a, saponificação, hidrólise de ácido, hidrólise alcalina, hidrólise enzimática (mencionado aqui como divisão) e hidrólise utilizando água comprimida quente. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que um óleo de triglicerídeo não necessita ser hidrolisado para produzir um oleoquímico;

em vez disso, o óleo pode ser convertido diretamente no oleoquímico desejado por outro processo conhecido. Por exemplo, o óleo de triglicerídeo pode ser diretamente convertido em ácido graxo de éster metila através de esterificação.

[00295] Em algumas modalidades, hidrólise catalítica do óleo produzido por métodos revelados aqui ocorre por dividir o óleo em glicerol e ácidos graxos. Como discutido acima, os ácidos graxos podem ser então adicionalmente processados através de várias outras modificações para obter oleoquímicos derivados. Por exemplo, em uma modalidade os ácidos graxos podem ser submetidos a uma reação de aminação para produzir compostos de nitrogênio graxo. Em outra modalidade, os ácidos graxos podem ser submetidos a ozonólise para produzir ácidos mono e dibásicos.

[00296] Em outras modalidades hidrólise pode ocorrer através da divisão de óleos produzidos aqui para criar oleoquímicos. Em algumas modalidades preferidas da invenção, um óleo de triglicerídeo pode ser dividido antes que outros processos sejam realizados. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que há muitos métodos de divisão de triglicerídeo apropriados, incluindo, porém não limitados a, divisão enzimática e divisão por pressão.

[00297] Genericamente, métodos de divisão de óleo utilizam enzimas, lipases, como biocatalisadores atuando em uma mistura de água/óleo. A divisão enzimática então divide o óleo ou gordura, respectivamente, em glicerol e ácidos graxos livres. O glicerol pode então migrar para a fase de água ao passo que a fase orgânica enriquece com ácidos graxos livres.

[00298] As reações de divisão enzimática ocorrem genericamente no limite de fase entre fase orgânica e aquosa, onde a enzima está presente somente no limite de fase. Triglicerídeos que encontram o limite de fase então contribui para ou participam na reação de divisão. À medida que a reação prossegue, a densidade de ocupação ou concentração de ácidos graxos ainda

quimicamente ligados como glicerídeos, em comparação com ácidos graxos livres, diminui no limite de fase de modo que a reação seja diminuída. Em certas modalidades, a divisão enzimática pode ocorrer em temperatura ambiente. Uma pessoa com conhecimentos comuns na técnica saberia as condições apropriadas para dividir óleo nos ácidos graxos desejados.

[00299] Como exemplo, a velocidade de reação pode ser acelerada por aumentar a superfície de limite de interface. Após término da reação, ácidos graxos livres são então separados da fase orgânica liberada da enzima, e o resíduo que ainda contém ácidos graxos quimicamente ligados como glicerídeos é realimentado ou reciclado e misturado com óleo novo ou gordura para ser submetido a divisão. Desse modo, glicerídeos reciclados são então submetidos a um processo de divisão enzimática adicional. Em algumas modalidades, os ácidos graxos livres são extraídos de um óleo ou gordura parcialmente dividida de tal modo. Desse modo, se os ácidos graxos quimicamente ligados (triglicerídeos) são retornados ou realimentados para o processo de divisão, o consumo de enzima pode ser drasticamente reduzido.

[00300] O grau de divisão é determinado como a razão do valor ácido medido dividido pelo valor ácido teoricamente possível que pode ser computado para um dado óleo ou gordura. Preferivelmente, o valor ácido é medido por intermédio de titulação de acordo com métodos comuns padrões. Alternativamente, a densidade da fase de glicerol aquosa pode ser tomada como uma medida para o grau de divisão.

[00301] Em uma modalidade, o processo de divisão como descrito aqui também é adequado para dividir o mono-, di- e triglicerídeo que estão contidos no denominado material de sabão dos processos de refinação alcalina dos óleos produzidos. Desse modo, o material de sabão pode ser quantitativamente convertido sem saponificação prévia dos óleos neutros nos ácidos graxos. Para essa finalidade, os ácidos graxos sendo quimicamente ligados nos sabões são liberados, preferivelmente antes da divisão, através de

uma adição de ácido. Em certas modalidades, uma solução tampão é utilizada além de água e enzima para o processo de divisão.

[00302] Em uma modalidade, óleos produzidos de acordo com os métodos da invenção também podem ser submetidos à saponificação como um método de hidrólise. Óleos de animal e planta são tipicamente feitos de triacilgliceróis (TAGs) que são ésteres de ácidos graxos com o álcool triídrico, glicerol. Em uma reação de hidrólise alcalina, o glicerol em um TAG é removido, deixando três anions carboxílicos que podem associar com os cátions de metal alcalino como sódio ou potássio para produzir sais de ácido graxo. Nesse esquema, os constituintes de ácido carboxílico são clivados da fração de glicerol e substituídos com grupos de hidroxila. A quantidade de base (por exemplo, KOH) que é utilizada na reação é determinada pelo grau desejado de saponificação. Se o objetivo for, por exemplo, produzir um produto de sabão que compreenda um pouco dos óleos originalmente presentes na composição de TAG, uma quantidade de base insuficiente para converter todos os TAGS em sais de ácido graxo é introduzida na mistura de reação. Normalmente, essa reação é executada em uma solução aquosa e prossegue lentamente, porém pode ser acelerada pela adição de calor. A precipitação dos sais de ácido graxo pode ser facilitada pela adição de sais, como haletos de metal alcalino solúveis em água (por exemplo, NaCl ou KCl), à mistura de reação. Preferivelmente, a base é um hidróxido de metal alcalino, como NaOH ou KOH. Alternativamente, outras bases como alcanol aminas, incluindo por exemplo trietanol amina e amino metil propanol, podem ser utilizadas no esquema de reação. Em alguns casos, essas alternativas podem ser preferidas para produzir um produto de sabão transparente.

[00303] Em alguns métodos, a primeira etapa de modificação química pode ser hidroprocessamento para saturar ligações duplas, seguido por desoxigenação em temperatura elevada na presença de hidrogênio e um

catalisador. Em outros métodos, hidrogenação e desoxigenação podem ocorrer na mesma reação. Ainda em outros métodos desoxigenação ocorre antes de hidrogenação. A Isomerização pode ser então opcionalmente executada, também na presença de hidrogênio e um catalisador. Finalmente, gases e componentes de nafta podem ser removidos se desejado. Por exemplo, vide as patentes 5.475.160 (hydrogenation of triglycerides); 5.091.116 (deoxygenation, hydrogenation and gas removal); 6.391.815 (hydrogenation); e 5.888.947 (isomerization).

[00304] Em algumas modalidades da invenção, os óleos de triglicerídeo são parcial ou totalmente desoxigenados. As reações de desoxigenação formam produtos desejados, incluindo, porém não limitados a, ácidos graxos, alcoóis graxos, polióis, cetonas e aldeídos. Em geral, sem ser limitado por nenhuma teoria específica, as reações de desoxigenação envolvem uma combinação de várias vias de reação diferentes, incluindo sem limitação: hidrogenólise, hidrogenação, hidrogenação-hidrogenólise consecutiva, hidrogenólise-hidrogenação consecutiva, e reações combinadas de hidrogenação-hidrogenólise, resultando pelo menos na remoção parcial de oxigênio a partir do ácido graxo ou éster de ácido graxo para produzir produtos de reação, como alcoóis graxos, que podem ser facilmente convertidos nos produtos químicos desejados por processamento adicional. Por exemplo, em uma modalidade, um álcool graxo pode ser convertido em olefinas através de reação de FCC ou em alcanos mais elevados através de uma reação de condensação.

[00305] Tal modificação química é hidrogenação, que é a adição de hidrogênio a ligações duplas nos constituintes de ácido graxo de glicerolipídeos ou de ácidos graxos livres. O processo de hidrogenação permite a transformação de óleos líquidos em gorduras sólidas ou semi-sólidas, que podem ser mais apropriadas para aplicações específicas.

[00306] Hidrogenação de óleo produzido pelos métodos descritos aqui

pode ser realizada em combinação com um ou mais dos métodos e/ou materiais fornecidos aqui, como relatado nos que se seguem: patentes US Nos. 7.288.278 (Food additives or medicaments); 5.346.724 (Lubrication products); 5.475.160 (Fatty alcohols); 5.091.116 (Edible oils); 6.808.737 (Structural fats for margarine and spreads); 5.298.637 (Reduced-calorie fat substitutes); 6.391.815 (Hydrogenation catalyst and sulfur adsorbent); 5.233.099 e 5.233.100 (Fatty alcohols); 4.584.139 (Hydrogenation catalysts); 6.057.375 (Foam suppressing agents); e 7.118.773 (Edible emulsion spreads).

[00307] Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que vários processos podem ser utilizados para hidrogenar carboidratos. Um método apropriado inclui contatar o carboidrato com hidrogênio ou hidrogênio misturado com um gás apropriado e um catalisador sob condições suficientes em um reator de hidrogenação para formar um produto hidrogenado. O catalisador de hidrogenação pode incluir genericamente Cu, Re, Ni, Fe, Co, Ru, Pd, Rh, Pt, Os, Ir, e ligas ou qualquer combinação dos mesmos, individualmente ou com promotores como W, Mo, Au, Ag, Cr, Zn, Mn, Sn, B, P, Bi, e ligas ou qualquer combinação dos mesmos. Outros materiais de catalisador de hidrogenação eficazes incluem níquel suportado ou rutênio modificado com rênio. Em uma modalidade, o catalisador de hidrogenação também inclui qualquer um dos suportes, dependendo da funcionalidade desejada do catalisador. Os catalisadores de hidrogenação podem ser preparados por métodos conhecidos por aqueles com conhecimentos comuns na técnica.

[00308] Em algumas modalidades o catalisador de hidrogenação inclui um catalisador de metal do Grupo VIII suportado e um material de esponja de metal (por exemplo, um catalisador de níquel de esponja). Níquel Raney provê um exemplo de um catalisador de níquel de esponja ativado apropriado para uso nessa invenção. Em outra modalidade, a reação de hidrogenação na invenção é realizada inutilizando um catalisador que compreende um



catalisador de níquel-rênio ou um catalisador de níquel modificado por tungstênio. Um exemplo de um catalisador apropriado para a reação de hidrogenação da invenção é um catalisador de rênio-níquel suportado por carbono.

[00309] Em uma modalidade, um catalisador de níquel Raney apropriado pode ser preparado por tratar uma liga de quantidades aproximadamente iguais em peso de níquel e alumínio com uma solução alcalina aquosa, por exemplo, contendo aproximadamente 25% em peso de hidróxido de sódio. O alumínio é seletivamente dissolvido pela solução alcalina aquosa que resulta em um material no formato de esponja compreendendo na maior parte níquel com quantidades menores de alumínio. A liga inicial inclui metais promotores (isto é, molibdênio ou cromo) na quantidade tal que aproximadamente 1 a 2 por cento em peso permanecem no catalisador de níquel de esponja formado. Em outra modalidade, o catalisador de hidrogenação é preparado utilizando uma solução de nitrosil nitrato de rutênio (III), cloreto de rutênio (III) em água para impregnar um material de suporte apropriado. A solução é então seca para formar um sólido tendo um teor de água menor do que aproximadamente 1% em peso. O sólido pode ser então reduzido em pressão atmosférica em um fluxo de hidrogênio a 300°C (não calcinado) ou 400°C (calcinado) em um forno de bola giratória por 4 horas. Após resfriamento e tornar o catalisador inerte com nitrogênio, 5% em volume de oxigênio em nitrogênio são passados sobre o catalisador por 2 horas.

[00310] Em certas modalidades, o catalisador descrito inclui um suporte de catalisador. O suporte de catalisador estabiliza e suporta o catalisador. O tipo de suporte de catalisador utilizado depende do catalisador escolhido e das condições de reação. Suportes apropriados para a invenção incluem, porém não são limitados a, carbono, sílica, sílica-alumina, zircônia, titânia, céria, vanádia, nitreto, nitreto de boro, heteropoliácidos,

hidroxiapatita, óxido de zinco, cromia, zeólitos, nanotubos de carbono, fluoreno de carbono e quaisquer combinações dos mesmos.

[00311] Os catalisadores utilizados na presente invenção podem ser preparados utilizando métodos convencionais conhecidos por aqueles versados na técnica. Métodos apropriados podem incluir, porém não são limitados a, umedecimento incipiente, impregnação evaporativa, depósito de vapor químico, revestimento por lavagem, técnicas de sublimação catódica de magnéton, e similares.

[00312] As condições para realizar a reação de hidrogenação variarão com base no tipo de material de partida e produtos desejados. Uma pessoa com conhecimentos comuns na técnica, com o benefício dessa revelação, reconhecerá as condições de reação apropriadas. Em geral, a reação de hidrogenação é realizada em temperaturas de 80°C a 250°C e preferivelmente em 90°C a 200°C, e mais preferivelmente em 100°C a 150°C. Em algumas modalidades, a reação de hidrogenação é realizada em pressões de 500 KPa a 14000KPa.

[00313] O hidrogênio utilizado na reação de hidrogenólise da presente invenção pode incluir hidrogênio externo, hidrogênio reciclado, hidrogênio gerado in situ, e qualquer combinação dos mesmos. Como utilizado aqui, o termo “hidrogênio externo” se refere a hidrogênio que não se origina da própria reação de biomassa, porém em vez disso é adicionado ao sistema a partir de outra fonte.

[00314] Em algumas modalidades da invenção, é desejável converter o carboidrato de partida em uma molécula menor que será mais facilmente convertida em hidrocarbonetos mais elevados desejados. Um método apropriado para essa conversão é através de uma reação de hidrogenólise. Vários processos são conhecidos para executar hidrogenólise de carboidratos. Um método apropriado inclui contatar um carboidrato com hidrogênio ou hidrogênio misturado com um gás apropriado e um catalisador de

hidrogenólise em um reator de hidrogenólise sob condições suficientes para formar um produto de reação que compreende moléculas menores ou polióis. Como utilizado aqui, o termo “polióis ou moléculas menores” inclui qualquer molécula que tenha um peso molecular menor, que pode incluir um número menor de átomos de carbono ou átomos de oxigênio do que o carboidrato de partida. Em uma modalidade, os produtos de reação incluem moléculas menores que incluem polióis e alcoóis. Uma pessoa com conhecimentos comuns na técnica seria capaz de escolher o método apropriado pelo qual realizar a reação de hidrogenólise.

[00315] Em algumas modalidades, um açúcar com 5 e/ou 6 carbonos ou álcool de açúcar pode ser convertido em propileno glicol, etileno glicol, e glicerol utilizando um catalisador de hidrogenólise. O catalisador de hidrogenólise pode incluir Cr, Mo, W, Re, Mn, Cu, Cd, Fe, Co, Ni, Pt, Pd, Rh, Ru, Ir, Os, e ligas ou qualquer combinação dos mesmos, individualmente ou com promotores como Au, Ag, Cr, Zn, Mn, Sn, Bi, B, O, e ligas ou qualquer combinação dos mesmos. O catalisador de hidrogenólise pode incluir também um catalisador de piropolímero carbonáceo contendo metais de transição (por exemplo, cromo, molibdênio, tungstênio, rênio, manganês, cobre, cádmio) ou metais do grupo VIII (por exemplo, ferro, cobalto, níquel, platina, paládio, ródio, rutênio, irídio e ósmio). Em certas modalidades, o catalisador de hidrogenólise pode incluir qualquer dos metais acima combinados com um óxido de metal alcalino terroso ou aderido a um suporte cataliticamente ativo. Em certas modalidades, o catalisador descrito na reação de hidrogenólise pode incluir um suporte de catalisador como descrito acima para a reação de hidrogenação.

[00316] As condições para realizar a reação de hidrogenólise variarão com base no tipo de material de partida e produtos desejados. Uma pessoa com conhecimentos comuns na técnica, com o benefício dessa revelação, reconhecerá as condições apropriadas para utilizar para realizar a reação. Em

geral, a reação de hidrogenólise é conduzida em temperaturas de 110°C a 300°C, e preferivelmente em 170°C a 220°C, e mais preferivelmente em 200°C a 225°C. Em algumas modalidades, a reação de hidrogenólise é conduzida sob condições básicas, preferivelmente em um pH de 8 a 13, e ainda mais preferivelmente em um pH de 10 a 12. Em algumas modalidades, a reação de hidrogenólise é conduzida em pressões em uma faixa entre 60 KPa e 16500 KPa, e preferivelmente em uma faixa entre 1700 KPa e 14000 KPa, e ainda mais preferivelmente entre 4800 KPa e 11000 KPa.

[00317] O hidrogênio utilizado na reação de hidrogenólise da presente invenção pode incluir hidrogênio externo, hidrogênio reciclado, hidrogênio gerado in situ e qualquer combinação dos mesmos.

[00318] Em algumas modalidades, os produtos de reação discutidos acima podem ser convertidos em hidrocarbonetos mais elevados através de uma reação de condensação em um reator de condensação (mostrado esquematicamente como reator de condensação 110 na figura 1). Em tais modalidades, a condensação dos produtos de reação ocorre na presença de um catalisador capaz de formar hidrocarbonetos mais elevados. Embora não desejando ser limitado por teoria, acredita-se que a produção de hidrocarbonetos mais elevados proceda através de uma reação de adição em etapas incluindo a formação de ligação de carbono-carbono ou carbono-oxigênio. Os produtos de reação resultantes incluem qualquer número de compostos contendo essas frações, como descrito em mais detalhe abaixo.

[00319] Em certas modalidades, catalisadores de condensação apropriados incluem um catalisador de ácido, um catalisador de base, ou um catalisador de ácido/base. Como utilizado aqui, o termo “catalisador de ácido/base” se refere a um catalisador que tenha uma funcionalidade tanto de ácido como de base. Em algumas modalidades o catalisador de condensação pode incluir, sem limitação, zeólitos, carbetos, nitretos, zircônia, alumina, sílica, aluminossilicatos, fosfatos, óxidos de titânio, óxidos de zinco, óxidos

de vanádio, óxidos de lantânio, óxidos de ítrio, óxidos de escândio, óxidos de magnésio, óxidos de cério, óxidos de bário, óxidos de cálcio, hidróxidos, heteropoliácidos, ácidos inorgânicos, resinas modificadas por ácido, resinas modificadas por base, e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o catalisador de condensação pode incluir também um modificador. Modificadores apropriados incluem La, Y, Sc, P, B, Bi, Li, Na, K, Rb, Cs, Mg, Ca, Sr, Ba, e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o catalisador de condensação pode incluir também um metal. Metais apropriados incluem Cu, Ag, Au, Pt, Ni, Fe, Co, Ru, Zn, Cd, Ga, In, Rh, Pd, Ir, Re, Mn, Cr, Mo, W, Sn, Os, ligas, e qualquer combinação dos mesmos.

[00320] Em certas modalidades, o catalisador descrito na reação de condensação pode incluir um suporte de catalisador como descrito acima para a reação de hidrogenação. Em certas modalidades, o catalisador de condensação é de auto-sustentação. Como utilizado aqui, o termo “auto-sustentação” significa que o catalisador não necessita de outro material para servir como suporte. Em outras modalidades, o catalisador de condensação é utilizado em combinação com um suporte separado apropriado para suspender o catalisador. Em uma modalidade, o suporte de catalisador de condensação é sílica.

[00321] As condições sob as quais a reação de condensação ocorre variação com base no tipo de material de partida e produtos desejados. Uma pessoa com conhecimentos comuns, com o benefício dessa revelação, reconhecerá as condições apropriadas a utilizar para realizar a reação. Em algumas modalidades, a reação de condensação é realizada em uma temperatura na qual a termodinâmica para a reação proposta é favorável. A temperatura para a reação de condensação variará dependendo do poliol ou álcool de partida específico. Em algumas modalidades, a temperatura para a reação de condensação está compreendida em uma faixa de 80°C a 500°C, e

preferivelmente de 125°C a 450°C, e mais preferivelmente de 125°C a 250°C. Em algumas modalidades, a reação de condensação é conduzida em pressões em uma faixa entre 0 KPa a 9000 KPa, e preferivelmente em uma faixa entre 0 KPa e 7000 KPa, e ainda mais preferivelmente entre 0 KPa e 5000 KPa.

[00322] Os alcanos mais elevados formados pela invenção incluem, porém não são limitados a, alcanos de cadeia reta ou ramificada que têm de 4 a 30 átomos de carbono, alcenos de cadeia reta ou ramificada que têm de 4 a 30 átomos de carbono, cicloalcanos que têm de 5 a 30 átomos de carbono, cicloalcenos que têm de 5 a 30 átomos de carbono, arilas, arilas fundidas, alcoóis, e cetonas. Alcanos apropriados incluem, porém não são limitados a, butano, pentano, penteno, 2-metil butano, hexano, hexeno, 2-metil pentano, 3-metil pentano, 2,2-dimetil butano, 2,3-dimetil butano, heptano, hepteno, octano, octeno, 2,2,4-trimetil pentano, 2,3-dimetil hexano, 2,3,4-trimetil pentano, 2,3-dimetil pentano, nonano, noneno, decano, deceno, undecano, undeceno, dodecano, dodeceno, tridecano, trideceno, tetradecano, tetradeceno, pentadecano, pentadeceno, nonildecano, nonildeceno, eicosano, eicoseno, uneicosano, uneicoseno, doeicosano, doeicoseno, trieicosano, trieicoseno, tetraeicosano, tetraeicoseno e isômeros dos mesmos. Alguns desses produtos podem ser apropriados para uso como combustíveis.

[00323] Em algumas modalidades, os cicloalcanos e os cicloalcenos são não substituídos. Em outras modalidades, os cicloalcanos e cicloalcenos são mono-substituídos. Ainda em outras modalidades, os cicloalcanos e cicloalcenos são multi-substituídos. Nas modalidades que compreendem os cicloalcanos e cicloalcenos substituídos, o grupo substituído inclui, sem limitação, uma alquila de cadeia reta ou ramificada tendo 1 a 12 átomos de carbono, um alquilenos de cadeia reta ou ramificada tendo 1 a 12 átomos de carbono, uma fenila, e qualquer combinação dos mesmos. Cicloalcanos e cicloalcenos apropriados incluem, porém não são limitados a, ciclopentano, ciclopenteno, cicloexano, cicloexeno, metil-ciclopentano, metil-ciclopenteno,

etil-ciclopentano, etil-ciclopenteno, etil-cicloexano, etil-cicloexeno, isômeros e qualquer combinação dos mesmos.

[00324] Em algumas modalidades, as arilas formadas são não substituídas. Em outra modalidade, as arilas formadas são mono-substituídas. Nas modalidades compreendendo as arilas substituídas, o grupo substituído inclui, sem limitação, uma alquila de cadeia reta ou ramificada tendo 1 a 12 átomos de carbono, um alquilenos de cadeia ramificada ou reta tendo 1 a 12 átomos de carbono, uma fenila, e qualquer combinação dos mesmos. Arilas apropriadas para a invenção incluem, porém não são limitadas a benzeno, tolueno, xileno, etil benzeno, para xileno, meta xileno e qualquer combinação dos mesmos.

[00325] Os alcoóis produzidos na invenção têm de 4 a 30 átomos de carbono. Em algumas modalidades, os alcoóis são cíclicos. Em outras modalidades, os alcoóis são ramificados. Em outra modalidade, os alcoóis são de cadeia reta. Alcoóis apropriados para a invenção incluem, porém não são limitados a, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol, undecanol, dodecanol, tridecanol, tetradecanol, pentadecanol, hexadecanol, heptil decanol, octil decanol, nonil decanol, eicosanol, uneicosanol, doeicosanol, trieicosanol, tetraeicosanol e isômeros dos mesmos.

[00326] As cetonas produzidas na invenção têm de 4 a 30 átomos de carbono. Em uma modalidade, as cetonas são cíclicas. Em outra modalidade, as cetonas são ramificadas. Em outra modalidade, as cetonas são de cadeia reta. Cetonas apropriadas para a invenção incluem, porém não são limitadas a, butanona, pentanona, hexanona, heptanona, octanona, nonanona, decanona, undecanona, dodecanona, tridecanona, tetradecanona, pentadecanona, hexadecanona, heptil decanona, octil decanona, nonil decanona, eicosanona, uneicosanona, doeicosanona, trieicosanona, tetraeicosanona e isômeros dos mesmos.

[00327] Outra tal modificação química é interesterificação.

Glicerolípídeos produzidos naturalmente não têm uma distribuição uniforme de constituintes de ácido graxo. No contexto de óleos, interesterificação se refere à permuta de radicais de acila entre dois ésteres de glicerolípídeos diferentes. O processo de interesterificação provê um mecanismo pelo qual os constituintes de ácido graxo de uma mistura de glicerolípídeos podem ser reorganizados para modificar o padrão de distribuição. Interesterificação é um processo químico bem conhecido, e compreende genericamente aquecer (até aproximadamente 200°C) uma mistura de óleos por um período (por exemplo, 30 minutos) na presença de um catalisador, como um metal alcalino ou alquilato de metal alcalino (por exemplo, metóxido de sódio). Esse processo pode ser utilizado para randomizar o padrão de distribuição dos constituintes de ácido graxo de uma mistura de óleo, ou pode ser dirigido à produção de um padrão de distribuição desejado. Esse método de modificação química de lipídeos pode ser realizado em materiais fornecidos aqui, como biomassa microbiana com uma percentagem de peso de célula seca como lipídeo de pelo menos 20%.

[00328] Interesterificação dirigida, na qual um padrão de distribuição específico de ácidos graxos é buscado, pode ser realizada por manter a mistura de óleo em uma temperatura abaixo do ponto de fusão de alguns TAGs que pode ocorrer. Isso resulta em cristalização seletiva desses TAGs, que remove eficazmente os mesmos da mistura de reação à medida que cristalizam. O processo pode ser continuado até que grande parte dos ácidos graxos no óleo tenham precipitado, por exemplo. Um processo de interesterificação dirigida pode ser utilizado, por exemplo, para produzir um produto com um teor mais baixo de caloria através da substituição de ácidos graxos de cadeia mais longa com cópias de cadeia mais curta. Interesterificação dirigida também pode ser utilizada para produzir um produto com uma mistura de gorduras que pode fornecer características de fusão e características estruturais desejadas procuradas em aditivos



alimentícios ou produtos (por exemplo, margarina) sem recorrer à hidrogenação, que pode produzir trans isômeros indesejáveis.

[00329] Interesterificação de óleos produzidos pelos métodos descritos aqui pode ser realizada em combinação com um ou mais dos métodos e/ou materiais, ou produzir produtos, como relatado nos que se seguem: patentes US Nos. 6.080.853 (Nondigestible fat substitutes); 4.288.378 (Peanut butter stabilizer); 5.391.383 (Edible spray oil); 6.022.577 (Edible fats for food products); 5.434.278 (Edible fats for food products); 5.268.192 (Low calorie nut products); 5.258.197 (Reduce calorie edible compositions); 4.335.156 (Edible fat product); 7.288.278 (Food additives or medicaments); 7.115.760 (Fractionation process); 6.808.737 (Structural fats); 5.888.947 (Engine lubricants); 5.686.131 (Edible oil mixtures); e 4.603.188 (Curable urethane compositions).

[00330] Em uma modalidade de acordo com a invenção, transesterificação do óleo, como descrito acima, é seguida por reação do produto transesterificado com poliol, como relatado na patente US 6.465.642, para produzir poliésteres de ácido graxo de poliol. Tal processo de separação e esterificação pode compreender as etapas como a seguir: reagir um éster de alquila inferior com poliol na presença de sabão; remover sabão residual da mistura de produto; lavar com água e secar a mistura de produto para remover impurezas; branquear a mistura de produto para refinamento; separar pelo menos uma porção do éster de alquila inferior não reagido do poliéster de ácido graxo de poliol na mistura de produto; e reciclar o éster de alquila inferior não reagido separado.

[00331] A transesterificação pode ser também realizada em biomassa microbiana com ésteres de ácido graxo de cadeia curta, como relatado na patente US 6.278.006. Em geral, a transesterificação pode ser realizada por adicionar um éster de ácido graxo de cadeia curta a um óleo na presença de um catalisador apropriado e aquecer a mistura. Em algumas modalidades, o

óleo compreende aproximadamente 5% a aproximadamente 90% da mistura de reação em peso. Em algumas modalidades, os ésteres de ácido graxo de cadeia curta podem ser aproximadamente 10% a aproximadamente 50% da mistura de reação em peso. Exemplos não limitadores de catalisadores incluem catalisadores de base, metóxido de sódio, catalisadores de ácido incluindo ácido inorgânicos como ácido sulfúrico e argilas acidificadas, ácidos orgânicos como ácido metano sulfônico, ácido benzeno sulfônico, e ácido tolueno sulfônico, e resinas ácidas como Amberlyst 15, Metais como sódio e magnésio, e hidretos de metal também são catalisadores úteis.

[00332] Outra modificação química é hidroxilação, que envolve a adição de água a uma ligação dupla resultando em saturação e incorporação de uma fração de hidroxila. O processo de hidroxilação provê um mecanismo para converter um ou mais constituintes de ácido graxo de um glicerolípídeo em um ácido graxo hidróxi. Hidroxilação pode ser realizada, por exemplo, através do método relatado na patente US 5.576.027, ácidos graxos hidroxilados, incluindo óleo de mamona e seus derivados, são úteis como componentes em várias aplicações industriais, incluindo aditivos alimentícios, tensoativos, agentes umectantes de pigmentos, agentes de desespumar, aditivos à prova de água, agentes de plastificação, agentes emulsificantes e/ou desodorantes cosméticos, bem como em eletrônica, produtos farmacêuticos, tintas, pinturas, adesivos e lubrificantes. Um exemplo de como a hidroxilação de um glicerídeo pode ser realizada é como a seguir: gordura pode ser aquecida, preferivelmente a aproximadamente 30 a 50°C combinada com heptano e mantida em temperatura por trinta minutos ou mais; ácido acético pode ser então adicionado à mistura seguido por uma solução aquosa de ácido sulfúrico seguido por uma solução de peróxido de hidrogênio aquosa que é adicionada em pequenos incrementos à mistura durante uma hora; após o peróxido de hidrogênio aquoso, a temperatura pode ser então aumentada para pelo menos aproximadamente 60°C e agitada por pelo menos seis horas; após

a agitação, a mistura é deixada assentar e uma camada aquosa inferior formada pela reação pode ser removida enquanto a camada de heptano superior formada pela reação pode ser lavada com água quente tendo uma temperatura de aproximadamente 60°C; a camada de heptano lavada pode ser então neutralizada com uma solução de hidróxido de potássio aquosa a um pH de aproximadamente 5 a 7 e então removida por destilação a vácuo; o produto de reação pode ser então seco a vácuo a 100°C e o produto seco desodorizado a vapor sob condições a vácuo e filtrado a aproximadamente 50° até 60° utilizando terra diatomácea.

[00333] Hidroxilação de óleos microbianos produzidos pelos métodos descritos aqui podem ser realizados em combinação com um ou mais dos métodos e/ou materiais, ou produzir produtos como relatado a seguir: patentes US 6.590.113 (Oil-based coatings and ink); 4.049.724 (Hydroxylation process); 6.113.971 (Olive oil butter); 4.992.189 (Lubricants and lube additives); 5.576.027 (Hydroxylated milk); 6.869.597 (Cosmetics).

[00334] Glicerolipídeos hidroxilados podem ser convertidos em estolides. Estolides consistem em um glicerolipídeo no qual um constituinte de ácido graxo hidroxilado foi esterificado com outra molécula de ácido graxo. A conversão de glicerolipídeos hidroxilados em estolides pode ser realizada por aquecer uma mistura de glicerolipídeos e ácidos graxos e contatar a mistura com um ácido mineral, como descrito por Isbell e outros, *JAACS* 71(2): 169-174 (1994). Estolides são úteis em uma variedade de aplicações, incluindo sem limitação aquelas relatadas a seguir: patentes US 7.196.124 (Elastomeric materials and floor coverings); 5.458.795 (Thickened oils for high-temperature applications); 5.451.332 (Fluids for industrial applications); 5.427.704 (Fuel additives); e 5.380.894 (Lubricants, greases, plasticizers, and printing inks).

[00335] Outras reações químicas que podem ser realizadas em óleos microbianos incluem reagir triacilgliceróis com um agente de ciclopropanação

para aumentar a fluidez e/ou estabilidade oxidativa, como relatado na patente US 6.051.539; fabricação de ceras de triacilgliceróis, como relatado na patente US 6.770.104; e epoxidação de triacilgliceróis, como relatado em "The effect of ácido graxo composition on the acrylation kinetics of epoxidized triacylglycerols", Journal of the American Oil Chemists' Society, 79:1, 59-63, (2001) e Free Radical Biology and Medicine, 37:1, 104-114 (2004).

[00336] A geração de biomassa microbiana que contém óleo para combustível e produtos químicos como descrito acima resulta na produção de farelo de biomassa deslipidado. Farelo deslipidado é um subproduto de preparar óleo de algas e é útil como ração de animais para animais de fazenda, por exemplo, ruminantes, aves, suínos e aquicultura. O farelo resultante, embora de teor reduzido de óleo, ainda contém proteínas de qualidade elevada, carboidratos, fibra, cinza, óleo residual e outros nutrientes apropriados para uma ração de animais. Como as células são predominantemente lisadas pelo processo de separação de óleo, o farelo deslipidado é facilmente digerível por tais animais. Farelo deslipidado pode ser opcionalmente combinado com outros ingredientes, como grão, em uma ração de animais. Como farelo deslipidado tem uma consistência em pó, pode ser prensado em pelotas utilizando um meio de extrusão ou expensor ou outro tipo de máquina, que são comercialmente disponíveis.

[00337] A invenção, tendo sido descrita em detalhe acima, é exemplificada nos seguintes exemplos, que são oferecidos para ilustrar, porém não limitar, a invenção reivindicada.

## **VII. EXEMPLOS**

### **EXEMPLO 1: Métodos para cultivar *Prototheca***

[00338] Cepas de *Prototheca* foram cultivadas para obter uma elevada percentagem de óleo por peso de célula seca. Células criopreservadas foram descongeladas em temperatura ambiente e 500 ul de células foram

adicionadas a 4,5 ml de meio (4,2 g/L  $K_2HPO_4$ , 3,1 g/L  $NaH_2PO_4$ , 0,24 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,25 g/L monoidrato de ácido cítrico, 0,025 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 2g/L extrato de levedura) mais 2% glicose e crescidas por 7 dias a 28°C com agitação (200 rpm) em uma placa de 6 cavidades. Pesos de célula seca foram determinados por centrifugar 1 ml de cultura a 14.000 rpm por 5 min. Em um tubo Eppendorf pré-pesado. O sobrenadante de cultura foi descartado e a pelota de célula resultante lavada com 1 ml de água deionizada. A cultura foi novamente centrifugada, o sobrenadante descartado, e as pelotas de célula colocadas a -80°C até congelarem. As amostras foram então liofilizadas por 24 h e pesos de célula seca calculados. Para determinação do total de lipídeos em culturas, 3 ml de cultura foram removidos e submetidos à análise utilizando um sistema Ankom (Ankon Inc., Macedon, NY) de acordo com o protocolo do fabricante. Amostras foram submetidas à extração de solvente com um extrator Amkom XT10 de acordo com o protocolo do fabricante. O total de lipídeos foi determinado como a diferença em massa entre amostras secas hidrolisadas por ácido e amostras secas, extraídas com solvente. As medições de percentagem de peso de célula seca de óleo são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8. Percentagem de óleo por peso de célula

Espécie	cepa	% Óleo
<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 327	13,14
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441	18,02
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1435	27,17

[00339] Amostras de microalgas das cepas listadas na Tabela 22 acima foram genotipadas. DNA genômico foi isolado de biomassa de algas com a seguir. Células (aproximadamente 200 mg) foram centrifugadas de culturas líquidas 5 minutos a 14.000 x g. Células foram então ressuspensas em água destilada estéril, centrifugadas 5 minutos a 14.000 x g e o sobrenadante descartado. Uma única conta de vidro ~2 mm de diâmetro foi adicionada à biomassa e tubos foram colocados em -80°C por pelo menos 15 minutos. As amostras foram removidas e 150 µl de tampão de trituração (1% Sarkosyl,

0,25 M sacarose, 50 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, RNase A 0,5 ug/ul) foram adicionados. As pelotas foram ressuspensas por vórtice brevemente, seguido pela adição de 40 ul de 5M NaCl. As amostras foram submetidas a vórtice brevemente, seguido pela adição de 66 ul de CTAB a 5% (brometo de trimetilamônio de cetila) e um vórtice breve final. Amostras foram a seguir incubadas a 65°C por 10 minutos após o que foram centrifugadas a 14,000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e extraído uma vez com 300 µl de Fenol: clorofórmio: álcool de isoamila 12:12:1, seguido por centrifugação por 5 minutos a 14.000 x g. A fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo contendo 0,7 vol. De isopropanol (~190 µl), misturada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos ou durante a noite a 4°C. DNA foi recuperado através de centrifugação a 14,000 x por 10 minutos. A pelota resultante foi então lavada duas vezes com etanol a 70%, seguido por uma lavagem final com etanol a 100%. Pelotas foram secas em ar por 20 a 30 minutos em temperatura ambiente seguido por ressuspensão em 50 µl de 10 mM TrisCl, 1 mM EDTA (pH 8,0).

[00340] Cinco µl de DNA de algas total, preparado como descrito acima, foram diluídos 1:50 em 10 mM Tris, pH 8,0. Reações de PCR, volume final 20 µl, foram montadas como a seguir. Dez µl de 2 x iProof HF máster mix (BIO-RAD) foram adicionados a 0,4 µl iniciador SZ02613 (5'-TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC-3' (SEQ ID NO:9) em 10mM concentração de estoque). Essa sequência iniciadora se estende da posição 567-588 no número de acesso Gen Bank L43357 e é altamente conservada em plantas superiores e genomas de plastídio de algas. Isso foi seguido pela adição de 0,4 µl iniciador SZ02615 (5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (SEQ ID NO:10) em 10 mM de concentração de estoque). Essa sequência iniciadora é complementar à posição 1112-1093 no. De acesso de Gen Bank L43357 e é altamente conservada em plantas superiores e genomas de

plastídio de algas. A seguir 5 µl de DNA total diluído e 3,2 µl de dH<sub>2</sub>O foram adicionados. Reações de PCR foram feitas como a seguir: 98°C, 45''; 98°C, 8''; 53°C, 12''; 72°C, 20'' por 35 ciclos seguido por 72°C por 1 min. e retendo a 25°C. Para purificação de produtos PCR, 20 µl de 10 mM Tris, pH 8,0, foi adicionado a cada reação, seguido por extração com 40 µl de fenol:clorofórmio:álcool de isoamila 12:12:1, submetendo a vórtice e centrifugando a 14,000 x g por 5 minutos. Reações de PCR foram aplicadas a colunas S-400 (GE Healthcare) e centrifugadas por 2 minutos a 3,000 x g. Produtos PCR purificados foram subsequentemente clonados TOPO em PCR8/GW/TOPO e clones positivos selecionados para placas LB/Spec. DNA de plasmídeo purificado foi seqüenciado nas duas direções utilizando iniciadores avançado e inverso M13, No total, doze cepas de *Prototheca* foram selecionadas para ter seu DNA rRNA 23S seqüenciado e as sequências são listadas na Listagem de sequências. Um sumário das cepas e Números de listagem de sequências é incluída abaixo. As sequências foram analisadas para divergência geral da sequência UTEX 1435 (SEQ ID NO: 15). Dois pares emergiram (UTEX 329/UTEX 1533 e UTEX 329/UTEX 1440) como os mais divergentes. Nos dois casos, alinhamento em pares resultou em 75,0% de identidade de sequência em pares. A percentagem de identidade de sequência para UTEX 1435 também é incluída abaixo.

<u>Espécie</u>	<u>cepa</u>	<u>% identidade</u>	<u>SEQ ID NO.</u>
<i>Prototheca kruegani</i>	UTEX 329	75,2	SEQ ID NO: 11
<i>Prototheca wickerhamii</i>	UTEX 1440	99	SEQ ID NO: 12
<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 1442	75,7	SEQ ID NO: 13
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 288	75,4	SEQ ID NO: 14
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1439; 1441;1435; 1437	100	SEQ ID NO: 15
<i>Prototheca wickerhamii</i>	UTEX 1533	99,8	SEQ ID NO: 16
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1434	75,9	SEQ ID NO: 17

*Prototheca zopfii* UTEX 1438 75,7 SEQ ID NO: 18

*Prototheca moriformis* UTEX 1436 88,9 SEQ ID NO: 19

[00341] Amostras de lipídeo de um subconjunto das cepas acima listadas foram analisadas para perfil de lipídeo utilizando HPLC. Os resultados são mostrados abaixo na tabela 9.

Tabela 9. Diversidade de cadeias de lipídeo em espécie de microalgas

Cepa	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
UTEX 327	0	12,01	0	0	50,33	17,14	0	0	0
UTEX 1441	1,41	29,44	0,70	3,05	57,72	12,37	0,97	0,33	0
UTEX 1435	1,09	25,77	0	2,75	54,01	11,90	2,44	0	0

[00342] Peptídeos de trânsito de plastídio de algas foram identificadas através da análise de bibliotecas de cDNA de UTEX 1435 (*Prototheca moriformis*) ou UTEX 250 (*Chlorella protothecoides*) como descrito nos exemplos 12 e exemplo 11 abaixo. cDNAs codificando proteínas potencialmente direcionadas ao plastídio com base em homologia de hit BLAST para outras proteínas direcionadas ao plastídio conhecidas foram submetidas à análise adicional pelos programas de software PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>), ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) são TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Peptídeos de trânsito de plastídio candidatos identificados através de pelo menos um desses três programas foram então amplificados em PCR do DNA genômico apropriado. Abaixo está um sumário das sequências de aminoácidos sequências de direcionamento de plastídio de algas (PTS) que foram identificadas a partir dessa seleção. São também incluídas as sequências de aminoácidos de tioesterases ACP-acila graxa de planta que são utilizadas nos exemplos de expressão heteróloga abaixo.

cDNA

SEQ ID NO.

*P.moriformis* isopentenil difosfato



sintase PTS	SEQ ID NO: 127
<i>P.moriformis</i> delta 12 ácido graxo	
desaturase PTS	SEQ ID NO: 128
<i>P.moriformis</i> estearoíla ACP	
desaturase PTS	SEQ ID NO: 129
<i>C.protothecoides</i> estearoíla ACP	
desaturase PTS	SEQ ID NO: 130
<i>Cuphea hookeriana</i> acila graxa-ACP	
tioesterase (C8-10)	SEQ ID NO: 131
<i>Umbellularia californica</i> acila graxa-ACP	
tioesterase (C12)	SEQ ID NO: 132
<i>Cinnamomum camphora</i> acila graxa-ACP	
tioesterase (C14)	SEQ ID NO: 133

## EXEMPLO 2: cultivo de *Prototheca* em vários insumos

### A. Sorgo

[00343] As seguintes cepas mostraram ser capazes de utilizar sorgo como uma fonte de carbono única: cepas de *Prototheca moriformis* UTEX 1435, UTEX 1437, UTEX 288, UTEX 1439, UTEX 1441 e UTEX 1434, e cepa *Prototheca stagnoran* UTEX 1442, A designação “UTEX” indica o número de cepa a partir da coleção de cultura de algas da Universidade de Texas, 1 University State A6700, Austin, Texas 78712-0183.

[00344] Sorgo puro foi adquirido de Maasdam Sorghum Mills (Lynnville, Iowa) com um perfil de açúcar de frutose 21,0% peso/peso, dextrose 28,0% peso/peso, sacarose 16,0% peso/peso e maltose <0,5% peso/peso. As culturas foram cultivadas em meio líquido contendo 2%, 5%, ou 7% (v/v) de sorgo puro (diluído a partir do material puro) como a única fonte de carbono e as culturas foram cultivadas heterotroficamente no escuro, agitando a ~350 rpm. As amostras a partir das culturas foram retiradas em 24, 40, 48, 67 e 89 horas e o crescimento foi medido utilizando leituras A750 em

um espectrofotômetro. O crescimento foi observado para cada das cepas testadas como mostrado nas figuras 1-2.

## **B. Celulose**

[00345] Forragem de milho explodida, úmida, Miscanthus, sorgo de forragem, polpa de beterraba e bagaço de cana de açúcar foram preparados pelo The National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO) por cozinhar em uma solução de ácido sulfúrico a 1,4% e desidratar a pasta resultante. As percentagens de sólidos foram determinadas gravimetricamente por secagem e foram como a seguir: forragem de milho, 25% de sólidos; Miscanthus, 28,7% de sólidos; sorgo de forragem, 26,7% de sólidos; e bagaço de cana de açúcar, 26% de sólidos.

[00346] Amostras úmidas de 100 gramas de materiais celulósicos explodidos (forragem de milho ou switch Grass) foram ressuspensas em água deionizada até um volume final de 420 mL e o pH foi ajustado para 4,8 utilizando 10N NaOH. Para polpa de beterraba, 9,8 gramas de sólidos secos foram levados até 350 mL com água deionizada e pH foi ajustado para 4,8 com 10 N NaOH. Para todos os insumos acima, Accellerase 1000 (Genencor, Nova York) foi utilizado em uma razão de 0,25 ml de enzima por grama de biomassa seca para sacarificação dos materiais celulósicos. As amostras foram incubadas com agitação (110 rpm) a 50°C por 72 horas. O pH de cada das amostras foi ajustado para 7,0 com NaOH (com alteração de volume desprezível), esterilizados com filtro através de um filtro de 0,22 µm e utilizado nos processos detalhados abaixo. Para processos em escala maior, o mesmo procedimento para sacarificação foi seguido exceto que uma etapa adicional de filtração de fluxo tangencial (TFF) ou etapa de microfiltração foi realizada para auxiliar na esterilização de filtro de insumos. Uma amostra de cada dos insumos preparada foi reservada para determinação de concentração de glicose e xilose utilizando um sistema baseado em HPLC/ELSD ou um kit baseado em hexocinase (Sigma). Adicionalmente, para polpa de beterraba, o

material foi inicialmente levado até o volume como com os outros insumos, o pH foi então ajustado para 4,0 e um tratamento de pectinase foi realizado a 50°C por 24 horas. O pH foi então ajustado para 4,8 se nenhuma etapa de lavagem foi conduzida ou 5,3 se etapas de lavagem foram conduzidas. Sacarificação enzimática foi então realizada com o mesmo procedimento utilizado para os outros insumos como descrito acima.

[00347] A cepa *Prototheca moriformis* de microalgas UTEX 1435 foi avaliada em relação a sua capacidade de crescer em uma série de insumos celulósicos preparados como descrito acima (forragem de milho, polpa de beterraba, cana de sorgo, Miscanthus e controle de glicose). A cultura de microalgas foi cultivada em condições descritas no exemplo 1 acima com a exceção da fonte de carbono. A fonte de carbono era 4% de glicose (para condições de controle) ou 4% de glicose como medido por glicose disponível nos materiais celulósicos. O crescimento foi avaliado por leituras A750 e o tempo de cultivo foi de 168 horas, com leituras A750 em 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após iniciação da cultura. Como pode ser visto na figura 7a, a cultura de *Prototheca moriformis* cresceu melhor em forragem de milho. Os outros insumos celulósicos utilizados, Miscanthus, cana de sorgo e polpa de beterraba, apresentaram todos, inibição de crescimento.

[00348] Com base nos resultados acima com açúcares celulósicos derivados de forragem de milho, acúmulo de lipídeo foi também avaliado em *Prototheca moriformis* utilizando níveis diferente de açúcares celulósicos derivados de forragem de milho e glicose de reagente como controle. Culturas foram crescidas em 18g/L de glicose que era totalmente de açúcares celulósicos derivados de forragem de milho (condição de 100% de forragem de milho na figura 7b), 9g/L glicose de açúcares celulósicos derivados de forragem de milho suplementados com 9g/L de glicose reagente (50% de forragem de milho suplementados com glicose a 180 g/L condição na figura 7b); 9g/L de glicose de açúcares celulósicos derivados de forragem de milho

(50% de forragem de milho, não suplementado; e 13 g/L de xilose reagente para controle de osmolaridade. Todas as culturas foram alimentadas com açúcares celulósicos para manter a concentração de glicose em 20 g/L, exceto para a cultura de controle, que foi alimentada com glicose reagente para manter a concentração de glicose em 20 g/L. o crescimento foi medido com base no peso de célula seca da cultura e produtividade de lipídeo foi determinada como uma percentagem de peso de célula seca. O total de lipídeos foi determinado gravimetricamente utilizando um sistema de extração de solvente/hidrólise de ácido Ankom como descrito no exemplo 1 acima.

[00349] Como pode ser visto na figura 7b, com base em acúmulo de biomassa (como medido por DCW), todas as concentrações dos celulósicos derivados de forragem de milho excederam em desempenho (DCW mais elevado) o meio de controle que foi alimentado com glicose apenas. A produção de lipídeo como uma percentagem de DCW foi também calculada para todas as condições. Além do acúmulo de biomassa mais elevada visto para crescimento em forragem de milho, o acúmulo de lipídeo também foi mais elevado nas condições de celulósicos derivados de forragem de milho em comparação com a condição de controle de glicose. Esses dados demonstram que além de fornecer açúcares derivados de celulósico, forragem de milho provê nutrientes/componentes adicionais que contribuem para um acúmulo aumentado de biomassa (crescimento) e rendimento de produto aumentado.

[00350] Como os insumos celulósicos contêm componentes além de glicose, alguns desses componentes adicionais podem acumular até níveis indesejáveis durante cultura à medida que mais açúcares derivados de celulósico são alimentados na cultura quando a fonte de carbono principal (normalmente, porém não limitado a, glicose) é consumida. Por exemplo, a xilose presente no insumo de açúcar derivado de celulósico pode acumular durante o cultivo em alta densidade de microalgas a níveis inibidores para

crescimento e produção de produto final. Para testar os efeitos de acúmulo de xilose durante cultivo de *Prototheca*, culturas foram cultivadas com 4% de glicose no meio e suplementadas com 0, 10 g/L, 25 g/L, 50 g/L e 100 g/L de xilose. Após 6 dias de cultura, crescimento e acúmulo de lipídeos foram avaliados utilizando os métodos descritos acima. Como visto na Figura 7c, surpreendentemente, as concentrações mais elevadas de xilose testada não foram inibidoras para a capacidade de *Prototheca moriformis* crescer e acumular lipídeo, e a cultura na realidade cresceu melhor e acumulou mais lipídeos nas concentrações mais elevadas de xilose. Para explorar esse fenômeno, um experimento similar foi realizado com sacarose, uma fonte de carbono que *Prototheca moriformis* do tipo selvagem é incapaz de metabolizar. Nenhum impacto positivo foi observado com sacarose, sugerindo que o acúmulo de lipídeos e crescimento aumentado vistos com xilose são atribuíveis a um mecanismo diferente da tensão osmótica de concentrações elevadas de componentes não metabolizados no meio e é específico de xilose.

[00351] Além de açúcares não metabolizados, sais podem acumular até níveis inibidores como resultado de concentrar açúcares derivados de lignocelulósico. Devido a etapa de hidrólise de ácido com  $H_2SO_4$  durante a preparação típica de materiais celulósicos seguida por neutralização do ácido com NaOH,  $Na_2SO_4$  é formado durante a geração de açúcares lignocelulósicos. Para avaliar o impacto de concentração de sal em crescimento e produção de lipídeo, culturas de *Prototheca moriformis* foram crescidas em concentrações de  $Na_2SO_4$  variando de 0-700 mM em meio suplementado com 4% de glicose. Como mostrado na figura 7d, uma inibição de crescimento significativa foi observada, como medido por acúmulo de DCW, onde concentrações de  $Na_2SO_4$  excederam 25 mM, especificamente nas concentrações de 80 mM, 240 mM e 700 mM. Além disso, o impacto de antiespumante P2000 foi avaliado no mesmo teste. O composto antiespumante teve um impacto positivo, significativo sobre a produtividade

de biomassa. A produtividade de lipídeo foi também avaliada para cada condição, e concentrações de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acima de 80 mM, especificamente 240 mM e 700 mM, foram inibidoras enquanto a adição de antiespumante P2000 aumentou significativamente a produtividade de lipídeo. Desse modo, em uma modalidade, as etapas de cultura dos métodos da presente invenção incluem cultivo em meio contendo um agente antiespumante.

[00352] Com base nos resultados discutidos acima e resumidos na figura 7a, inibidores estavam provavelmente presentes nos insumos celulósicos que apresentam crescimento ruim. A presente invenção provê meio de remover tais compostos por lavar os materiais com água quente (tratamento hidrotérmico). A Figura 8 resume os resultados de crescimento, como medido por A750, utilizando açúcar derivado de insumo celulósico com uma única lavagem de água quente. As condições de cultura foram idênticas às utilizadas nos processos resumidos na figura 7a. em comparação com os resultados mostrados na figura 7a, após apenas uma lavagem com água quente, culturas de *Prototheca moriformis* cresceram melhor em todos os insumos celulósicos testados, especificamente bagaço de cana de açúcar, cana de sorgo, Miscanthus e polpa de beterraba, em comparação com controle de glicose. A produtividade de lipídeo também foi avaliada em cada das condições. Exceto para a condição de polpa de beterraba, que foi comparável ao controle de glicose, culturas cultivadas em açúcares derivados de materiais celulósicos submetidos a uma lavagem com água quente apresentaram melhor produtividade de lipídeo do que o controle de glicose.

[00353] Um impacto potencial de tratamento hidrotérmico (lavagem com água quente), de biomassa celulósica é a remoção de furfurais e hidroximetil furfurais liberados pela explosão de ácido do material. A presença de furfurais e hidroximetil furfurais pode ter contribuído para crescimento limitado observado em alguns dos processos resumidos na figura 7a. para avaliar como o tratamento hidrotérmico afetou os níveis de furfurais (FA) e

hidroxi metil furfurais (HMF), sobrenadantes que resultam de uma a três lavagens de biomassa celulósica derivados de bagaço de cana de açúcar (B), cana de sorgo (S), *Miscanthus* (M) ou polpa de beterraba (BP) foram ensaiados em relação a FA e HMF por HPLC. Como mostrado na figura 8, níveis de FA e HMF diminuem significativamente com cada etapa de lavagem. Esse resultado é compatível com a observação de que FA e HMF pode ser inibidor ao crescimento de microalgas (como visto na figura 7a) e que o tratamento hidrotérmico remove esses compostos e resulta em crescimento aperfeiçoado de microalgas, ainda melhor do que o crescimento nas condições de glicose de controle (como visto na figura 8).

[00354] O impacto sobre o perfil de lipídeo de culturas de *Prototheca moriformis* crescidas nos vários açúcares derivados de lignocelulósico tratados hidrotérmicamente foi avaliada. Culturas de *Prototheca moriformis* foram cultivadas nos seguintes insumos celulósicos lavados 4x: *Miscanthus*, bagaço de cana de açúcar e cana de sorgo, com níveis de glicose mantidos a 20 g/L através da alimentação dos açúcares celulósicos. Na conclusão da cultura, biomassa de microalgas de cada condição foi analisada em relação ao perfil de lipídeo utilizando os métodos descritos no exemplo 1, Os resultados da análise de perfil de lipídeo (expresso em % de área) são resumidos na tabela 10 abaixo. Cada condição foi testada em duplicata, e os resultados de cada das condições de teste em duplicata são incluídos. O crescimento em insumos celulósicos resultou em uma redistribuição significativa no perfil de lipídeos em comparação com o controle de glicose. Por exemplo, houve um aumento significativo em % de área de C18:0 em todas as condições de insumo celulósico em comparação com a condição de controle de glicose.

Tabela 10. Perfil de lipídeo de *Prototheca moriformis* crescida em açúcares derivados de celulósico e glicose

	glicose 1 (ctrl)	glicose 2 (ctrl)	bagaço 1	bagaço 2	sorgo 1	sorgo 2	<i>Miscan</i> 1	<i>Miscan</i> 2
C10:0	n.d.	n.d.	0,03	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C12:0	0,04	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04
C14:0	1,64	1,64	1,07	1,10	1,17	1,14	1,08	1,12

C14:1	0,03	0,04	0,04	0,04	0,06	0,06	0,03	0,03
C15:0	0,04	0,05	0,07	0,05	0,08	0,08	0,06	0,06
C16:0	26,80	26,81	22,32	22,81	22,09	22,19	23,45	23,62
C16:1	0,75	0,82	1,68	1,70	1,92	2,12	1,38	1,23
C17:0	0,14	0,16	0,28	0,17	0,29	0,27	0,21	0,19
C17:1	0,07	0,06	0,10	0,10	0,13	0,12	0,10	0,09
C18:0	3,56	3,64	15,88	10,40	15,30	12,37	10,15	8,69
C18:1	54,22	54,01	49,87	53,87	49,35	50,80	54,05	55,26
C18:2	11,23	11,11	6,54	7,91	7,47	8,80	7,71	7,88
C18:3	0,84	0,85	0,39	0,56	0,47	0,53	0,56	0,60
alfa								
C20:0	0,31	0,30	0,85	0,63	0,76	0,69	0,63	0,56
C20:1	0,15	0,15	0,33	0,28	0,32	0,32	0,27	0,25
C20:3	0,06	0,06	0,13	0,12	0,14	0,12	0,11	0,11
C24:0	0,12	0,12	0,22	0,19	0,22	0,20	0,18	0,15

n.d. indica nenhum detectado

[00355] O fluxo de açúcar celulósico foi gerado de forragem de milho explodida, sacarificada utilizando enzima Accellerase e concentrado utilizando evaporação a vácuo. Esse fluxo de açúcar foi testado em ensaios de crescimento de *Prototheca moriformis* a uma concentração de glicose a 4%. Os resultados dos ensaios de crescimento mostraram crescimento muito ruim e o fluxo de açúcar celulósico foi testado em relação a condutividade (teor de sal). A condutividade era muito elevada, bem maior do que 700 mM de equivalentes de sódio, um nível que foi mostrado como sendo inibidor ao crescimento como descrito acima e mostrado na Figura 7d. Os métodos da invenção incluem métodos nos quais o sal é reduzido ou removido de açúcares derivados de lignocelulósico antes da utilização desses insumos na produção de óleo de microalga derivado de lignocelulósico. Surpreendentemente, entretanto, não se pode utilizar resinas para dessalinizar fluxos concentrados de açúcar, deve-se primeiramente diluir o fluxo concentrado de açúcar. Para demonstrar essa modalidade da invenção, açúcares celulósicos derivados de material de forragem de milho foram diluídos oito vezes antes da remoção de sais de contaminação com a resina. A condutividade inicial do material de partida concentrado foi de 87 mS/cm enquanto aquela do fluxo diluído oito vezes foi de 10990 uS/cm em um pH de 5,61, Estudos anteriores tinham indicado que a falha em diluir o fluxo concentrado de açúcar antes da deionização resultou em incapacidade de



remover sais quantitativamente bem como uma perda significativa de glicose a partir do fluxo de açúcar. Três volumes de leito diferentes de resinas IEX (DOWEX Marathon MR3) foram utilizados (1:2, 1:4 e 1:10). A Tabela 11 resume os resultados que demonstram a capacidade de uma resina de permuta de íon de leito misto (IEX) reduzir os sais (como medido por condutividade) significativamente em um fluxo de açúcar celulósico derivado de forragem de milho anteriormente concentrado em insumos diluídos.

Tabela 11. Capacidade de resina IEX reduzir sais.

Volume de leito resina: celulósicos	pH pós-deionização	Condutividade pós-deionização ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Condutividade calculada pós-deionização e 8x re-concentração ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Na <sup>+</sup> equivalentes (baseado em curva padrão) em mM
1:2	3,1	74	592	7,42
1:4	3,1	97	776	9,7
1:10	5,25	6320	50560	634

[00356] Um processo empregando um volume de leito 1:4 :insumo celulósico e re-concentração do material oito vezes resultaria em uma concentração de sódio está compreendido na faixa para biomassa normal e acúmulo de lipídeo. Alternativamente, a remoção de sal ou deionização pode ser realizada antes da sacarificação ou após sacarificação, porém antes da concentração do fluxo de açúcar. Se remoção de sal for realizada antes da concentração do fluxo de açúcar, uma etapa de diluição do fluxo de açúcar antes da remoção de sal provavelmente não seria necessária.

[00357] Esse exemplo demonstra a eficácia de lavagem de material celulósico explodido para o uso em produção de óleo celulósico. Como descrito acima, concentração de açúcares derivados celulosicamente sem a remoção de sais (inerente à produção de material celulósico explodido e tratamento subsequente) resulta em fermentações inferiores a ideais. Os materiais tratados no processo descrito abaixo foram do pH apropriado para sacarificação subsequente. Além disso, a condutividade desse material foi significativamente reduzida (mais de 100 vezes) a partir do insumo de partida. Portanto, os açúcares concentrados subsequentes para serem utilizados em fermentações não foram inibidores devido à presença de sais em excesso.

Uma vantagem adicional é vista pela remoção de furfurais a partir do material celulósico. Qualquer xilose ou glicose removida na fração hemicelulósica pode ser descartada ou preferivelmente reconcentrada para ser utilizada em fermentações.

[00358] Bagaço de cana de açúcar explodido, úmido (NREL, Colorado) com uma massa inicial de partida de 65 kg de peso úmido e condutividade de 15.000 uS/cm, pH 2,4 foi levado até 128 kg com água deionizada e o pH ajustado para 4,6 com 10 N NaOH, fazendo a condutividade resultante 6,800 uS/cm). A percentagem de sólidos foi avaliada por remoção de uma alíquota dos materiais suspensos para um recipiente de alumínio tarado (peso = t), registrando o peso úmido (peso = w) seguido por secagem por três horas a 110°C. Após secagem as amostras foram removidas para um dessecador e deixadas chegar à temperatura ambiente (25°C) em cujo ponto, foram novamente pesadas (peso = d). a percentagem de sólidos foi calculada como: % sólidos =  $[(d-t/w-t)] \times 100$ . As condutividades foram medidas em um medidor Thermo Electron Orion Star Conductivity.

[00359] O bagaço de cana de açúcar foi lavado em um modo semi-contínuo por misturar continuamente a pasta celulósica (percentagem inicial de sólidos de 8,2%) em uma temperatura de 50°C em um reator de aço inoxidável (capacidade de 150 L). Celulósicos foram descarregados do recipiente de reator através de uma bomba de carga giratória em uma taxa de fluxo de 1,9 a 3,8 kg/min. em uma centrífuga de decantar Modelo 660 Sharles. Permeado líquido foi retido em batelada (alíquotas de cerca de 35-175 kg , vide a tabela 12 abaixo) e alíquotas homogêneas removidas para avaliação de total de açúcares (glicose e xilose) e percentagem de sólidos como descrito na tabela 12, A condutividade e pH do material celulósico foram controlados através da adição de água deionizada e 10 N NaOH, respectivamente. As amostras 1 a 10 na Tabela 12 representam permeado centrífugo decantado e como tal sólidos e açúcares presentes nestas frações

são removidos dos materiais celulósicos lavados finais. Um cálculo de equilíbrio de massa de total de sólidos em comparação com sólidos removidos menos sólidos perdidos mais sólidos finais para sacarificação, resultou em uma recuperação de 99% no processo acima. A figura 8 resume a concentração de furfural e hidroximetil furfurais (mg/L) em cada dos 11 permeados de centrífuga coletados e descritos na tabela 12. Esses dados demonstram uma remoção clara de furfurais e hidroximetil furfurais a partir do bagaço de cana de açúcar.

Tabela 12. Equilíbrio de massa para tratamento hidrotérmico semi-contínuo de bagaço de cana de açúcar.

Amostra	kg (úmido)	kg (seco)	pH	Condutividade $\mu\text{S/cm}$	Total xilose removida (g)	Total glicose removida (g)
1 material inicial)	128	10,50	4,60	6,880	0	0
2	81,8	2,03		3,280	1030,68	286,3
3	76,5	0,49		2,500	298,35	76,50
4	106	0,41			254,40	63,60
5	173,9	0,30	3,74	1,260	226,07	69,56
6	101,8	0,08	4,40	791	71,26	20,36
7	110,6	0,04	4,86	327	44,24	0
8	77,2	0			0	0
9	108,6	0,02	4,7	221	0	0
10	101,5	0			0	0
11	34,8	0	4,7	146	0	0
Sólidos removidos (amostras 1-10) perdidos no processo		3,37				
Total xilose removida					1925,00	
Total glicose removida						516,32
Sólidos finais para sacarificação	7,03					

[00360] Em outra demonstração da capacidade de *Prototheca* utilizar insumo derivado de celulósico, *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) foi cultivado em biorreatores de três litros utilizando açúcar derivada de celulósico como um insumo de carbono fixo. O inóculo foi preparado de células criopreservadas, que foram descongeladas em temperatura ambiente e 1 mL de células foi adicionado a 300 mL de meio inóculo baseado no meio de microalgas basal descrito no exemplo com 1 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 g/L de extrato

de levedura e uma solução de elemento residual, mais 4% de glicose e cultivado por 1 dia a 28 °C com agitação (200 rpm). Essa cultura foi utilizada para inocular um biorreator de três litros contendo 1 L de meio mais 0,26 mL de Antiespumante 204 (Sigma, EUA). O fermentador foi controlado a 28°C e pH foi mantido a 6,8 por adição de KOH. Oxigênio dissolvido foi mantido a 30% de saturação por agitação em cascata e fluxo de ar. Insumo de açúcar celulósico de forragem de milho foi alimentado à cultura para manter 0-10 g/L de glicose. Dessalinização de insumos de açúcar celulósico a menos de 300 mM de sal foi essencial para assegurar peso de célula seca similar e desempenho de acúmulo de lipídeo em comparação com controles de insumo de açúcar purificado. Dessalinização do insumo de açúcar celulósico foi realizada utilizando os métodos descritos acima. Amostras de fermentador foram removidas para monitorar desempenho de fermentação. Acúmulo de massa de célula foi monitorada por densidade óptica e peso de célula seca. Concentrações de Glicose, xilose, amônia, potássio, sódio e furfural foram também determinadas e monitoradas durante todo o curso de fermentação. A concentração de lipídeo foi determinada por métodos gravimétricos discutidos acima.

### **EXEMPLO 3: Métodos para transformar *Prototheca***

#### **A. Método geral para transformação biolística de *Prototheca***

[00361] Portadores de ouro S550d de Seashell Technology foram preparados de acordo com o protocolo do fabricante. Plasmídeo linearizado (20 µ.g) foi misturado com 50 µl de tampão de ligação e 60 µl (30 mg) de portadores de ouro S550d e incubados em gelo por 1 min. O tampão de precipitação (100 ul) foi adicionado, e a mistura foi incubada em gelo por mais um 1 min. após submeter a vórtice, partículas revestidas com DNA foram formadas em pelotas por rotação a 10,000 rpm em uma microcentrífuga Eppendorf 5415C por 10 segundos. A pelota de ouro foi lavada uma vez com

500 µl de etanol a 100% frio, formada em pelota por rotação breve na microcentrífuga, e ressuspensa com 50 µl de etanol gelado. Após sonicação breve (1-2 s), 10 µl de partículas revestidas com DNA foram imediatamente transferidas para a membrana de portador.

[00362] Cepas de *Prototheca* foram cultivadas em meio de proteose (2g/L extrato de levedura, 2,94mM NaNO<sub>3</sub>, 0,17mM CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0,3mM MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0,4mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,28mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,43mM NaCl) em um agitador giratório até atingir uma densidade de células de 2x10<sup>6</sup> células/ml. As células foram colhidas, lavadas uma vez com água destilada estéril, e ressuspensas em 50 ul de meio. 1 x 10<sup>7</sup> células foram espalhadas na terça parte central de uma placa de meio de proteose não seletiva. As células foram bombardeadas com o sistema de Distribuição de partícula biolística PDS-1000/He (Bio-Rad). Discos de ruptura (1100 e 1350 psi) foram utilizados, e as placas são colocadas 9 e 12 cm abaixo da montagem de macroportador/tela. As células foram deixadas recuperar a 25°C por 12-24 h. Após recuperação, as células foram raspadas das placas com uma espátula de borracha, misturadas com 100 µl de meio e espalhadas em placas contendo a seleção de antibiótico apropriada. Após 7-10 dias de incubação a 25°C, colônias representando células transformadas eram visíveis nas placas de discos de ruptura de 1100 e 1350 psi e de 9 e 12 cm de distâncias. Colônias foram captadas e colocadas em placas de agar seletivo para um Segundo turno de seleção.

## **B. Transformação de *Prototheca* com Gene de resistência G418**

[00363] *Prototheca moriformis* e outras cepas de *Prototheca* sensíveis a G418 podem ser transformadas utilizando os métodos descritos abaixo. G417 é um antibiótico de aminoglicoside que inibe a função de ribossomas 80S e desse modo inibe síntese de proteína. O gene de resistência correspondente funciona através de fosforilação resultando em

inativação de G418, Cepas de *Prototheca* UTEX 1435, UTEX 1439 e UTEX 1437 foram selecionadas para transformação. Todas as três cepas de *Prototheca* foram genotipadas utilizando os métodos descritos acima. Todas as três cepas de *Prototheca* tinham sequências genômicas 23s rRNA (SEQ ID NO: 15).

[00364] Todos os cassetes de transformação foram clonados como fragmentos EcoRI-SacI em pUC 19, Técnicas de biologia molecular padrão foram utilizadas no construto de todos os vetores de acordo com Sambrook e Russel, 2001. O promotor beta-tubulin *C. reinhardtii*/5' UTR foi obtido de plasmídeo pHyg3 (Berthold e outros, (2002), Protist: 153(4), pág. 401-412) por PCR como um fragmento EcoRI-AscI. A reductase de nitrato *Chlorella vulgaris* 3'UTR foi obtida de DNA genômico isolado de cepa UTEX 1803 através de PCR utilizando os seguintes pares de iniciador:

Direto:

5' TGACCTAGGTGATTAATTAAGCTCGAGGCAGCAGCAGCTCGGA TAGTATCG 3' (SEQ ID NO:35)

Reverso:

5' CTACGAGCTCAAGCTTTCCATTTGTGTTC CCATCCCCTACTTCC 3' (SEQ ID NO:36)

[00365] O promotor de desidrogenase glutamato *Chlorella sorokiniana* /UTR foi obtido através de PCR de DNA genômico isolado de cepa UTEX 1230 através de PCR utilizando os seguintes pares de iniciador:

avancado: 5' GATCAGAATTCCGCCTGCAACGCAAGG GCAGC 3' (SEQ ID NO:37)

Reverso: 5' GCATACTAGTGGCGGGACGGAGAGA GGGCG 3' (SEQ ID NO:38)

[00366] Otimização de códon foi baseada nos códons na Tabela 1 para *Prototheca moriformis*. A sequência do cassete de fosfotransferase neomicina

(nptII) não otimizado com códon foi sintetizada como um fragmento AscI-XhoI e foi baseado sobre a sequência de número de acesso Genbank YP\_788126, O cassete nptII otimizado com códon foi também baseado nesse número de acesso Genbank.

[00367] As três cepas de *Prototheca* foram transformadas utilizando métodos biolísticos descritos acima. Em resumo, as cepas de *Prototheca* foram cultivadas heterotroficamente em meio líquido contendo glicose a 2% até atingirem a densidade desejada de células ( $1 \times 10^7$  células/mL a  $5 \times 10^7$  células/mL). As células foram colhidas, lavadas uma vez com água destilada estéril e suspensas novamente a  $1 \times 10^8$  células/mL. 0,5 mL de células foram então espalhadas em uma placa de meio sólido não seletivo e deixadas secar em um capuz estéril. As células foram bombardeadas com o Sistema de distribuição de partícula biolístico PDS-1000/He (BioRad). As células foram deixadas recuperar a 25°C por 24 horas. Após recuperação, as células foram removidas por lavagem das placas com 1 mL de meio estéril e transferindo para placas novas contendo 100 ug/mL G418. Células foram deixadas secar em um capuz estéril e colônias foram deixadas formar na placa em temperatura ambiente por até três semanas. As colônias de UTEX 1435, UTEX 1439 e UTEX 1437 foram captadas e colocadas em placas de agar seletivo para um Segundo turno de seleção.

[00368] Um subconjunto de colônias que sobreviveram a um segundo turno de seleção descrito acima, foi cultivado em pequeno volume e DNA genômico e RNA foram extraídos utilizando métodos de biologia molecular padrão. Southern blots foram feitos em DNA genômico extraído de não transformado (WT), transformantes e DNA de plasmídeo. DNA de cada amostra foi passado em géis agarose a 0,8% após os seguintes tratamentos: não digerido (U), digerido com AvrII (A), digerido com NcoI (N), digerido com SacI (S). DNA desses géis foi manchado em membranas de Nylon+ (Amersham). Essas membranas foram sondadas com um fragmento que

corresponde à região de codificação inteira do gene *nptII* (sonda NeoR). A figura 4 mostra mapas dos cassetes utilizados nas transformações. A figura 5 mostra os resultados de análise de Southern blot em três transformantes (todos gerados na cepa UTEX 1435) (1, 2 e 3) transformados com *beta-tubulin::neo::nit* (SEQ ID NO: 39) (transformantes 1 e 2) ou desidrogenase glutamato:neo:nit (SEQ ID NO: 40) (transformante 3). O plasmídeo de transformação de desidrogenase glutamato:neo:nit foi passado como um controle e cortado com NcoI e SacI. AvrII não corta nesse plasmídeo. DNA genômico isolado de cepa UTEX 1435 não transformada não mostra hibridização à sonda de NeoR.

[00369] Transformantes adicionais contendo os construtos de desidrogenase glutamato:neo:nit (SEQ ID NO: 41) otimizada por códon e  $\beta$ -tubulina::neo::nit (SEQ ID NO:42) otimizada por códon foram captadas e analisadas por análise Southern blot. Como esperado, somente digestões com SacI mostram linearização do DNA de transformação. Esses eventos de transformação são compatíveis com eventos de integração que ocorrem na forma de oligômeros do plasmídeo de transformação. Somente após digestão com enzimas de restrição que cortam no DNA de plasmídeo de transformação que essas moléculas cedem para o tamanho do plasmídeo de transformação.

[00370] Análise Southern blot foi também realizada em transformantes gerados após transformação de cepas de *Prototheca* UTEX 1437 e UTEX 1439 com o cassete de desidrogenase glutamato ::neo::nit. O blot foi sondado com a sonda NeoR e os resultado são similares aos transformantes UTEX 1435. Os resultados são indicativos de eventos de integração caracterizados por oligomerização e integração do plasmídeo de transformação. Esse tipo de evento de integração é conhecido como correndo bem comumente em *Dictyostelium discoideum* (vide, por exemplo, Kuspa, A. e Loomis, W. (1992) *PNAS*, 89:8803-8807 e Morio e outros., (1995) *J. Plant Res.* 108:111-114).

[00371] Para confirmar adicionalmente a expressão do plasmídeo de



transformação, análise Northern blot e análise RT-PCR foram realizadas em transformantes selecionados. A extração de RNA foi realizada utilizando Reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante. A análise Northern blot foi feita de acordo com os métodos publicados em Sambrook e Russel, 2001. O total de RNA (15 µg) isolado de cinco transformantes UTEX 1435 e UTEX 1435 não transformado (faixas de controle) foi separado em gel de formaldeído – agarose a 1% e manchado em membrana de náilon. O blot foi hibridizado com a sonda neo-não otimizada específica para sequências de transgene em transformantes 1 e 3. Os dois outros RNAs de transformantes expressam a versão otimizada de códon do neo-transgene e como esperado, baseado na homologia de sequência entre os neo genes otimizado e não otimizado, mostraram sinal de hibridização significativamente inferior.

[00372] RNA (1 µg) foi extraído de cepa de *Prototheca* não transformada UTEX 1435 e dois transformantes UTEX 1435 representativos e transcritos inversos utilizando um iniciador oligo dT ou um iniciador específico de gene. Subseqüentemente esses cDNAs (em duplicata) foram submetidos à análise qPCT em Termociclador ABI Veriti utilizando química qPCR SYBR utilizando os seguintes iniciadores (nptII):

Direto: 5' GCCGCGACTGGCTGCTGCTGG 3' (SEQ ID NO:43)

Reverso: 5' AGGTCCTCGCCGTCGGGCATG 3' (SEQ ID NO:44)

[00373] A contaminação de DNA genômico possível foi descartada por uma amostra de controle negativo sem transcriptase inversa. Os resultados indicaram que os genes NeoR utilizados para transformar essas cepas são ativamente transcritos nos transformantes.

### **C. Transformação de *Prototheca* com Invertase de sacarose heteróloga secretada**

[00374] Todos os seguintes experimentos foram realizados utilizando placas de Agar/meio líquido com base no meio basal descrito em Ueno e outros, (2002) J. Bioscience and Bioengineering 94(2):160-65, com a adição

de minerais residuais descritos na patente US número 5,900,370, e 1x coquetel de vitamina DAS (1000x solução): tricina: 9g, tiamina HCL: 0,67 g, biotina: 0,01 g, cianocobalamina (vitamina B12): 0,008 g, pantotenato de cálcio: 0,02 g e ácido p-aminobenzóico: 0,04g.

[00375] Dois construtos de plasmídeo foram montados utilizando técnicas de DNA recombinante padrão. Os genes de invertase de sacarose de levedura (um otimizado com códon e um não otimizado com códon), suc2, estavam sob o controle do promotor beta-tubulin *Chlorella reinhardtii*/5' UTR e tinham a reductase de nitrato *Chlorella vulgaris* 3'UTR. As sequências (incluindo as sequências 5'UTR e 3'UTR) para o construto não otimizado por códon (Cr $\beta$ -tub::NCO-suc2::CvNitRed) , SEQ ID NO: 57, e construto otimizado por códon (Cr $\beta$ -tub::CO-suc2::CvNitRed), SEQ ID NO: 58, são listadas na Listagem de sequências. A otimização de códon foi baseada na tabela 1 para *Prototheca* SP. A figura 6 mostra um diagrama esquemático dos dois construtos com os sítios de clonagem de restrição relevantes e setas indicando a direção de transcrição. A seleção foi fornecida por Neo R (otimizado por códon utilizando a Tabela 1).

[00376] A preparação do microportador de ouro/DNA; microportadores de ouro/DNA foram preparados imediatamente antes do uso e armazenados em gelo até aplicação em macroportadores. O DNA de plasmídeo (no tampão TE) foi adicionado a 50  $\mu$ g de tampão de ligação. A saturação das contas de ouro foi obtida em 15  $\mu$ g de DNA de plasmídeo para 3 mg de portador de ouro. O tampão de ligação e DNA foram misturados bem através de vórtice. O DNA e tampão de ligação devem ser pré-misturados antes da adição de ouro para assegurar ligação uniforme de plasmídeo com partículas de portador de ouro. 60  $\mu$ l de portador de ouro S550d (Seashell Technologies, San Diego, CA) foram adicionados à mistura de tampão de ligação/DNA. Para um estoque de ouro em 50 mg/ml, a adição de 60  $\mu$ l resulta em uma razão ótima de 15  $\mu$ g DNA/ 3 mg de portador de ouro. A

mistura de DNA/portador de ouro foi deixada incubar em gelo por '1 minuto e então 100 µl de tampão de precipitação foi adicionado. A mistura foi deixada incubar novamente em gelo por 1 minuto e então brevemente submetida a vórtice e centrifugada a 10,000 rpm em temperatura ambiente por 10 segundos para formar pelota do portador de ouro. O sobrenadante foi cuidadosamente removido com uma pipeta e a pelota foi lavada com 500 µl de etanol a 100% gelado. As partículas de ouro foram repeletizadas por centrifugação novamente a 10,000 rpm por 10 segundos. O etanol foi removido e 50 µl de etanol gelado foram adicionados à mistura de ouro. Imediatamente antes da aplicação do ouro a macroportadores, o ouro/etanol foi suspenso novamente com um breve pulso de 1-2 segundos no nível 2 em um sonicador MISONIX utilizando a micro ponta. Imediatamente após resuspensão, 10 µl das partículas de ouro dispersas foram transferidas para o macroportador e deixadas secar em um capuz estéril.

[00377] As duas cepas de *Prototheca moriformis* (utex 1435 E 1441) foram cultivadas heterotroficamente em um meio líquido contendo glicose a 2% a partir de frascos criopreservados. Cada cepa foi cultivada até uma densidade de  $10^7$  células/ml. Essa cultura de semente foi então diluída com meio novo até uma densidade de  $10^5$  células/ml e deixada crescer por 12-15 horas para obter uma densidade final de células de aproximadamente  $10^6$  células/ml. As microalgas foram formadas em alíquotas em tubos cônicos de 50 ml e centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm. As células foram lavadas com meio novo e centrifugadas novamente por 10 minutos a 3500 rpm. As células foram então suspensas novamente em uma densidade de  $1,25 \times 10^8$  células/ml em meio novo.

[00378] Em um capuz estéril, 0,4 ml das células preparadas acima foram removidos e colocados diretamente no centro de uma placa de Agar (sem agente de seleção). A placa foi suavemente oscilada com um movimento circular de nível para distribuir uniformemente as células a um diâmetro não

maior do que 3 cm. As células foram deixadas secar sobre as placas no capuz estéril por aproximadamente 30-40 minutos e então foram bombardeadas em uma pressão de disco de ruptura de 1350 psi e uma placa até distância de macroportador de 6 cm. As placas foram então cobertas e envoltas com parafilme e deixadas incubadas sob luz baixa por 24 horas.

[00379] Após a recuperação de 24 horas, 1 ml de meio estéril (sem glicose) foi adicionado ao gramado de células. As células foram suspensas novamente utilizando um loop estéril, aplicado em um movimento circular ao gramado de células e as células suspensas novamente foram coletadas utilizando uma pipeta estéril. As células foram então revestidas sobre uma placa de Agar nova com 2% de glicose e 100 ug/ml de G418, O aparecimento de colônias ocorreu 7-12 dias após revestimento. Colônias individuais foram captadas e crescidas em meio seletivo com glicose a 2% e 100 ug/ml G418. As células do tipo selvagem (não transformadas) e transgênicas foram então analisadas para introdução bem sucedida, integração e expressão do transgene.

[00380] DNA genômico de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 e 1441 transformadas e suas cópias do tipo selvagem (não transformadas) foram isoladas utilizando métodos padrão. De forma resumida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 14,000 rpm em uma centrífuga Eppendorf de topo de mesa padrão (5418) e congeladas flash antes da extração de DNA. Pelotas de células foram lisadas por adição de 200 µL de tampão de lise (100 mM Tris HCl, pH 8,0, 1% de sarcosina de laurila, 50 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0,25 M de sacarose, 0,5 mg/ml RNase A) para cada 100-200 mg de células (peso úmido) e submetidas a vórtice por 30-60 segundos. Brometo de trimetil amônio cetila (CTAB) e NaCl foram levados a 1% e 1 M, respectivamente, e extratos de célula foram incubados a 60-65°C por 10 minutos. Subsequentemente, os extratos foram clarificados através de centrifugação a 14,000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi

extraído com um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool de isoamila (25:24:1). As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 14,000 rpm e a fase aquosa removida. DNA foi precipitado com 0,7 volumes de isopropanol. DNA foi peletizado via centrifugação em 14.000 rpm por 10 minutos e lavado duas vezes com etanol 80%, e uma vez com etanol. Após secagem, DNA foi suspenso novamente em 10 mM Tris HCl, pH 8,0 e concentrações de DNA foram determinados utilizando ensaio de quantificação de fluorescência PicoGreen (Molecular Probes).

[00381] RNA de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 e 1441 transformados e suas cópias do tipo selvagem (não transformada) foram isoladas utilizando métodos padrão. Em resumo, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 14,000 rpm em uma centrífuga Eppendorf de topo de mesa padrão (modelo 5418) e congelado flash antes da extração de RNA. As pelotas de células foram lisadas por adição de 1 mL de reagente Trizol (Sigma) para cada 100 mg de células (peso úmido) e por submeter a vórtice por 1-2 minutos. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos e subsequentemente ajustadas com 200 uL de clorofórmio por 1 mL de reagente Trizol. Após agitação extensa, as células foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos e então submetidas à centrifugação a 14000rpm por 15 minutos em uma microcentrífuga de topo de mesa refrigerada. A divisão de RNA para a fase aquosa superior foi removida e precipitada por adição de isopropanol (500 µL por 1 ml de reagente Trizol). RNA foi coletado por centrifugação por 10 minutos e a pelota resultante foi lavada duas vezes com 1 mL de etanol a 80%, seca, e suspensa novamente em água livre de RNase. A concentração de RNA foi estimada por ensaio de quantificação de fluorescência de RiboGreen (Molecular Probes).

[00382] A expressão de gene fofotransferase de neomicina conferindo resistência a antibiótico G418 e invertase de levedura foi ensaiada em

*Prototheca moriformis* UTEX 1435 e 1441 e transformantes T98 (transformante UTEX 1435) e T97 (transformante UTEX 1441) utilizando análise PCR quantitativa de transcrição inversa (RT-qPCR). 20 ng de RNA total (isolado como descrito acima) foi submetido à análise de RT0qPCR de uma etapa utilizando kit iScript SYBR Green RT-PCR (BioRad Laboratories) e pares de iniciador tendo como alvo o gene de resistência a neomicina (iniciador avançado 5'CCGCCGTGCTGGACGTGGTG 3' e iniciador inverso 5' GGTGGCGGGGTCCAGGGTGT 3'; SEQ ID NOs: 65 e 66, respectivamente) e transcritos de invertase *suc2* (iniciador avançado 5' CGGCCGGCGGCTCCTTCAAC 3' e iniciador inverso 5' GGCGCTCCCGTAGGTCGGGT 3'; SEQ ID NO: 67 e 68, respectivamente). Transcritos beta-tubulin endógenos serviram como um controle positivo interno para amplificação de PCR e como uma referência de normalização para estimar níveis de transcrito relativo.

[00383] Ambos os construtos otimizados por códon e não otimizada por códon foram transformadas em células de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 e 1441 como descrito acima. Inicialmente, transformantes foram obtidos com ambas os construtos e a presença do transgene foi verificada por análise Southern blot seguido por RTPCR para confirmar a presença do DNA e mRNA do transgene. Para a análise de Southern blot, DNA genômico isolado como descrito acima foi submetido a eletroforese em géis de agarose a 0,7% em 1x tampão TAE. Géis foram processados como descrito em Sambrook e outros. (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Sondas foram preparadas por iniciação aleatória e hibridizações realizadas como descrito em Sambrook e outros. Transformantes dos construtos tanto otimizados por códon como não otimizados por códon mostraram a presença do cassete de invertase, enquanto o controle não transformado era negativo. mRNAs de invertase foi também detectado em transformantes com construtos tanto otimizados por códon

como não otimizados por códon.

[00384] Para confirmar que os transformantes estavam expressando uma proteína de invertase ativa, os transformantes foram revestidos em placas de sacarose. Os transformantes contendo o cassete otimizado não códon falharam em crescer nas placas contendo sacarose, indicando que, embora o gene e o mRNA codificando a proteína SUC 2 estivessem presentes, a proteína não estava (i) sendo traduzida, ou (2) sendo traduzida, porém não acumulando a níveis suficientes para permitir crescimento em sacarose como a fonte de carbono única. Para avaliar os níveis de invertase sendo expressos por esses transformantes, dois clones (T98 e T97) foram submetidos a um ensaio de invertase de células inteiras raspadas do meio sólido e amostragem direta e quantificação de açúcares nos sobrenadantes de cultura após 48 horas de crescimento no meio líquido contendo 2% de sacarose como a fonte de carbono único.

[00385] Para o ensaio de invertase, as células (T98 e T97) foram cultivadas em placas contendo sacarose a 2%, raspadas e ensaiadas em relação à atividade de invertase. 10 µl das células raspadas foram misturadas com 40 µl de 50 mM NaOAc pH 5,1, 12,5 µl de 0,5 M sacarose foi adicionado à mistura de células e incubado a 37°C por 10-30 minutos. Para parar a reação, 75 µl de 0,2 M K<sub>2</sub>HPOO<sub>4</sub> foram adicionados. Para avaliar glicose liberada, 500 µl de reagente reconstituído (glicose oxidase / peroxidase + o-Dianisidina) de Sigma (GAGO-20 kit de ensaio) foram adicionados a cada tubo e incubados a 37°C por 30 minutos. Uma curva padrão de glicose foi também criada nesse momento (faixa: 25 µg a 0,3 µg de glicose). Após incubação, 500 µl de 6N HCl foram adicionados para parar a reação e desenvolver a cor. As amostras foram lidas a 540 nm. A quantidade de glicose liberada foi calculada a partir da curva padrão de glicose utilizando a fórmula  $y=mx+c$ , onde y é a leitura de 540 nm, e x é µg de glicose. O peso de glicose foi convertido em mols de glicose, e dada a relação equimolar entre

mols de sacarose hidrolisado em mols de glicose gerada, os dados foram expressos como nmols de sacarose hidrolisada por tempo unitário. O ensaio mostrou que ambos os clones T98 e T97 eram capazes de hidrolisar sacarose, indicando que uma invertase de sacarose funcional estava sendo produzida e secretada pelas células.

[00386] Para a análise de açúcar em meio de cultura líquido após 48 horas de crescimento de algas, células T97 e T98 foram cultivados em meio contendo sacarose a 2% por 48 horas e os meios de cultura foram processados para análise de açúcar. Caldos de cultura de cada transformante (e controle de célula não transformada negativo) foram centrifugados a 14,000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi removido e submetido HPLC/ELSD (detecção de dispersão de luz evaporativa). A quantidade de açúcar em cada amostra foi determinada utilizando padrões externos e análise de regressão linear. Os níveis de sacarose nos meios de cultura dos transformantes eram muito baixos (menos de 1,2 g/L, e na maioria dos casos 0g/L). nos controles negativos, os níveis de sacarose permaneceram elevados, em aproximadamente 19 g/L após 48 horas de crescimento.

[00387] Esses resultados foram compatíveis com os resultados de atividade de invertase, e tomados juntos, indicaram que os transformantes otimizados por códon, T97 e T98, secretaram uma invertase de sacarose ativa que permitiu que as microalgas utilizassem sacarose como a fonte de carbono única ao contrário dos (1) transformantes não otimizados por códon e (2) as microalgas do tipo selvagem não transformadas, os quais não poderiam utilizar sacarose como a fonte de carbono único no meio de cultura.

[00388] Cepas de *Prototheca moriformis*, T98 e T97, expressando um transgene de invertase de sacarose secretada funcional (SUC2) foram ensaiadas em relação a crescimento e produção de lipídeo utilizando sacarose como a fonte de carbono única.

[00389] Cepas do tipo selvagem (não transformadas) T98 e T97 foram



cultivadas em meios de crescimento (como descrito acima) contendo glicose a 4% ou sacarose a 4% como a fonte de carbono única sob condições heterotróficas por aproximadamente 6 dias. O crescimento, como determinado por leituras de densidade óptica A750 foram tiradas de todas as quatro amostras a cada 24 horas e o peso de célula seca das culturas e perfis de lipídeo foram determinadas após os 6 dias de crescimento. As leituras de densidade óptica das cepas transgênicas cultivadas em condições tanto de glicose como de sacarose foram comparáveis com as cepas do tipo selvagem crescidas nas condições de glicose. Esses resultados indicam que as cepas transgênicas foram capazes de crescer em glicose ou sacarose como a fonte de carbono única em uma taxa igual a cepas do tipo selvagem em condições de glicose. As cepas do tipo selvagem não transformadas não cresceram na condição de sacarose somente.

[00390] A biomassa para a cepa do tipo selvagem crescida em glicose e cepa T98 crescida em sacarose foi analisada em relação ao perfil de lipídeo. Amostras de lipídeo foram preparadas de biomassa seca (liofilizadas) utilizando um Sistema de Hidrólise de ácido (Ankom Technology, NY) de acordo com as instruções do fabricante. Determinações de perfil de lipídeo foram realizadas como descrito no exemplo 4. O perfil de lipídeo para a cepa de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 não transformada, crescida em glicose como a fonte de carbono única e duas cepas T98 coloniais (UTEX 1435 transformada com um transgene de invertase de sacarose), crescida em sacarose como a fonte de carbono única, são revelados na Tabela 13 (UTEX 1435 do tipo selvagem e T98 clone 8 e cone 11 abaixo. C:19:0 lipídeo foi utilizado com um controle de calibragem interno.

Tabela 13. Perfil de lipídeo de clones UTEX 1435 e UTEX 1435 do tipo selvagem com transgene suc2.

Nome	Tipo selvagem ( % de área - ISTD)	T98 clone 11 ( % área - ISTD)	T98 clone 8 (% área - ISTD)
C 12:0	0,05	0,05	0,05
C 14:0	1,66	1,51	1,48
C 14:1	0,04	nd	nd

C 15:0	0,05	0,05	0,04
C 16:0	27,27	26,39	26,50
C 16:1	0,86	0,80	0,84
C 17:0	0,15	0,18	0,14
C 17:1	0,05	0,07	0,05
C 18:0	3,35	4,37	4,50
C 18:1	53,05	54,48	54,50
C 18:2	11,79	10,33	10,24
C 19:0 (ISTD)	--	--	--
C 18:3 alfa	0,90	0,84	0,81
C 20:0	0,32	0,40	0,38
C 20:1	0,10	0,13	0,12
C 20:1	0,04	0,05	0,04
C 22:0	0,12	0,16	0,12
C 20:3	0,07	0,08	0,07
C 24:0	0,12	0,11	0,10
nd - denota nenhum detectado			

[00391] Óleo extraído de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 do tipo selvagem (\*via extração de solvente ou utilizando uma prensa expelidora (vide os métodos no exemplo 44 acima) foi analisado em relação a carotenóides, clorofila, tocoferóis, outros esteróis e tocotrienóis. Os resultados são resumidos abaixo na Tabela 14.

Tabela 14. Análise de carotenóide, clorofila, tocoferol/esteróis e tocotrienol em óleo extraído de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435).

	Óleo prensado (mcg/ml)	Óleo extraído por solvente (mcg/ml)
cis-Luteína	0,041	0,042
trans-Luteína	0,140	0,112
trans-Zeaxantina	0,045	0,039
cis-Zeaxantina	0,007	0,013
t-alfa-Critoxantina	0,007	0,010
t-beta-Critoxantina	0,009	0,010
t-alfa-Caroteno	0,003	0,001
c-alfa-Caroteno	Nenhum detectado	Nenhum detectado
t-beta-Caroteno	0,010	0,009
9-cis-beta-Caroteno	0,004	0,002
Licopeno	Nenhum detectado	Nenhum detectado
Total Carotenóides	0,267	0,238
Clorofila	<0,01 mg/kg	<0,01 mg/kg
Tocoferóis e esteróis		
	Óleo prensado (mg/100g)	Óleo extraído por solvente (mg/100g)
gama Tocoferol	0,49	0,49
Campesterol	6,09	6,05
Stigmasterol	47,6	47,8
Beta-sitosterol	11,6	11,5
Outros esteróis	445	446
Tocotrienóis		
	Óleo prensado (mg/g)	Óleo extraído por solvente (mg/g)
alfa Tocotrienol	0,26	0,26
beta Tocotrienol	<0,01	<0,01
gama Tocotrienol	0,10	0,10
delta Tocotrienol	<0,01	<0,01
Total Tocotrienóis	0,36	0,36

[00392] A capacidade de utilizar sacarose como a fonte de carbono única como o fator de seleção para clones contendo o construto de transgene *suc2* em vez de G418 (ou outro antibiótico) foi avaliada utilizando os transformantes de gene *suc2* positivo. Um subconjunto dos transformantes positivos foi cultivado em placas contendo sacarose como a fonte de carbono única e sem seleção de antibiótico para 24 duplicações. Os clones foram então desafiados com placas contendo glicose como a fonte de carbono única e G418. Houve um subconjunto de clones que não cresceu na condição de glicose +G418, indicando uma perda de expressão do transgene. Um experimento adicional foi realizado utilizando uma placa contendo sacarose como a fonte de carbono única e nenhum G418 e riscando um clone que expressa transgene *suc2* em uma metade da placa e *Prototheca moriformis* do tipo selvagem na outra metade da placa. O crescimento foi visto com ambas as células *Prototheca moriformis* contendo transgene e do tipo selvagem. *Prototheca moriformis* do tipo selvagem não demonstrou a capacidade de crescer em sacarose, portanto, esse resultado mostra que diferente de resistência a antibiótico, o uso de seleção de invertase/sacarose não é autônomo de célula. É muito provável que os transformantes estavam secretando invertase de sacarose suficiente na placa/meios para suportar crescimento do tipo selvagem visto que a sacarose foi hidrolisada em frutose e glicose.

#### **EXEMPLO 4: *Prototheca* recombinante com gene TE exógeno**

[00393] Como descrito acima, as cepas de *Prototheca* podem ser transformadas com genes exógenos. *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) foi transformada, utilizando métodos descritos acima, com gene de tioesterase *Umbellularia californica* C12 ou gene de tioesterase *Cinnamomum camphora* C14 (ambos otimizados por códon de acordo com a tabela 1). Cada dos construtos de transformação continha uma região de 5'UTR/promotor de

desidrogenase de glutamato *Chlorella sorokiniana* (SEQ ID NO: 69) para acionar a expressão do transgene tioesterase. As regiões de codificação de transgenes de tioesterases de tioesterase *Umbellularia californica* C12 (SEQ ID NO: 70) ou tioesterase C14 *Cinnamomum camphora* C14 (SEQ ID NO: 71), cada uma com a sequência de direcionamento para plastídio putativo nativa. Imediatamente após a sequência de codificação de tioesterase está a sequência de codificação para um tag 3x-FLAG terminal-c (SEQ ID NO: 72), seguido pela reductase de nitrato *Chlorella vulgaris* 3'UTR (SEQ ID NO: 73). Um diagrama dos construtos de tioesterase que foram utilizadas nas transformações de *Prototheca moriformis* é mostrado na figura 9.

[00394] A preparação do DNA, microportador de ouro e células de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) foi realizada inutilizando os métodos descritos acima no exemplo 3, As microalgas foram bombardeadas utilizando a mistura de DNA – microportador de ouro e revestidas em placas de seleção contendo glicose a 2% e 100 ug/ml de G418, As colônias foram deixadas desenvolver por 7 a 12 dias e colônias foram captadas de cada placa de transformação e selecionadas para incorporação de construto de DNA utilizando ensaios de Southern blots e expressão dos construtos de tioesterase foi selecionada utilizando RT-PCR.

[00395] Clones positivos foram captados de ambas as placas de transformação de tioesterase C12 e C14 e selecionados para incorporação de construto utilizando ensaios de Southern blot. Os ensaios de Southern blot foram realizando utilizando métodos padrão (e descritos acima no exemplo 3) utilizando sondas c otimizadas, com base na sequência em SEQ ID NO: 70 e SEQ ID NO: 71, O DNA de plasmídeo de transformação foi passado como um controle positivo. Dos clones que foram positivos para incorporação de construto, um subconjunto foi selecionado para análise de PCR quantitativo de transcrição inversa (RT-qPCR) para expressão de tioestearase C12 e tioesterase C14.

[00396] O isolamento de RNA foi realizado utilizando métodos descritos no exemplo 3 acima e RT-qPCR dos clones positivos foram realizados utilizando 20 ng de RNA total de cada clone utilizando o par de iniciadores abaixo descrito e kit iScript SYBR Green RT-PCR (Bio-Rad Laboratories) de acordo com o protocolo do fabricante. RNA total de *Prototheca moriformis* do tipo selvagem (não transformado) foi incluído como um controle negativo. A expressão de mRNA foi expressa como expressão de vez relativa (RFE) em comparação com o controle negativo. Os iniciadores que foram utilizados na seleção de RT-qPCR de transformação de tioesterase C12 foram:

Iniciadores de PCR de tioesterase *U. californica* C12:

Avançado: 5' CTGGGCGACGGCTTCGGCAC 3' (SEQ ID NO: 74)

Reverso: 5' AAGTCGCGGCGCATGCCGTT 3' (SEQ ID NO: 75)

[00397] Os iniciadores que foram utilizados na seleção de RT-qPCR de transformação de tioesterase C14 foram:

Iniciadores de PCR de tioesterase C14 *Cinnamomum camphora*:

Direto: 5' TACCCCGCCTGGGGCGACAC 3' (SEQ ID NO: 76)

Reverso: 5' CTTGCTCAGGCGGCGGGTGC 3' (SEQ ID NO: 77)

[00398] Os resultados de RT-qPCR para expressão de tioesterase C12 nos clones positivos mostraram um RFE aumentado de aproximadamente 40 vezes para mais de 200 vezes de expressão aumentada em comparação com controle negativo. Resultados similares foram vistos com expressão de tioesterase C14 nos clones positivos com um RFE de aumento de aproximadamente 60 vezes a mais de 1200 vezes de expressão aumentada em comparação com controle negativo.

[00399] Um subconjunto dos clones positivos de cada transformação (como selecionado por ensaios de Southern blotting e RT-qPCR) foi selecionado e crescido sob condições repletas de nitrogênio e analisado em

relação à produção e perfil total de lipídeo. Amostras de lipídeo foram preparadas de biomassa seca de cada clone. 20-40 mg de biomassa seca de cada clone transgênico foram suspensos novamente em 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 3% em MeOH, e 200 µL de tolueno contendo uma quantidade apropriada de um padrão interno apropriado (C19:0) foi adicionado. A mistura foi sonicada brevemente para dispersar a biomassa, a seguir aquecida a 65-70°C por duas horas. 2 mL de heptano foram adicionados para extrair os ésteres de metila de ácido graxo, seguido por adição de 2 mL de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 6% (aq) para neutralizar o ácido. A mistura foi agitada vigorosamente, e uma porção da camada superior foi transferida para um frasco contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anidro) para análise de cromatografia de gás utilizando métodos GC/FID FAME (detecção de ionização de chama cromatografia de gás de éster metílico de ácido graxo) padrão. O perfil de lipídeo (expresso como % de área) dos clones positivos em comparação com controle negativo do tipo de selvagem são resumidos nas tabelas 15 e 16 abaixo. Como mostrado na tabela 15, o aumento em vezes de produção C12 nos transformantes C12 variou de aproximadamente um aumento de 5 vezes (clone C12-5) a aumento de mais de 11 vezes (clone C12-1). O aumento em vezes de produção de C14 nos transformantes C14 variou de um aumento de aproximadamente 1,5 vezes até um aumento de aproximadamente 2,5 vezes.

Tabela 15. Sumário de perfil de lipídeo total dos transformantes de tioesterase *Prototheca moriformis* C12

	Tipo selvagem	C12-1	C12-2	C12-3	C12-4	C12-5	C12-6	C12-7	C12-8
C6:0	0,03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C8:0	0,11	0,09	nd	0,11	nd	nd	nd	nd	nd
C10:0	nd	nd	nd	0,01	0,01	nd	nd	0,01	nd
C12:0	0,09	1,04	0,27	0,72	0,71	0,50	0,67	0,61	0,92
C14:0	2,77	2,68	2,84	2,68	2,65	2,79	2,73	2,56	2,69
C14:1	0,01	nd	nd	0,02	nd	nd	nd	0,01	nd
C15:0	0,30	0,09	0,10	0,54	0,19	0,09	0,13	0,97	0,09
C15:1	0,05	nd	nd	0,02	nd	nd	nd	nd	nd
C16:0	24,13	23,12	24,06	22,91	22,85	23,61	23,14	21,90	23,18
C16:1	0,57	0,62	0,10	0,52	0,69	0,63	0,69	0,49	0,63
C17:0	0,47	0,24	0,27	1,02	0,36	0,17	0,26	2,21	0,19
C17:1	0,08	nd	0,09	0,27	0,10	0,05	0,09	0,80	0,05
C18:0	nd	nd	2,14	1,75	2,23	2,16	2,38	1,62	2,47

C18:1	22,10	23,15	24,61	21,90	23,52	19,30	22,95	20,22	22,85
C18:1	nd	0,33	0,24	nd	nd	0,09	0,09	nd	0,11
C18:2	37,16	34,71	35,29	35,44	35,24	36,29	35,54	36,01	35,31
C18:3 alfa	11,68	11,29	9,26	11,62	10,76	13,61	10,64	11,97	10,81
C20:0	0,15	0,16	0,19	0,16	0,16	0,14	0,18	0,14	0,18
C20:1	0,22	0,17	0,19	0,20	0,21	0,19	0,21	0,20	0,21
C20:2	0,05	nd	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,04
C22:0	nd	nd	nd	0,01	nd	nd	nd	0,02	nd
C22:1	nd	nd	nd	nd	nd	0,01	nd	0,01	nd
C20:3	0,05	nd	0,07	0,06	0,06	0,10	0,07	0,05	0,06
C20:4	nd	nd	nd	nd	nd	0,02	nd	nd	nd
C24:0	nd	nd	0,24	0,01	0,20	0,19	0,19	0,14	0,20

Tabela 16. Sumário de perfil total de lipídeos dos transformantes de tioesterase de *Prototheca moriformis* C14,

	Tipo selvagem	C14-1	C14-2	C14-3	C14-4	C14-5	C14-6	C14-7
C6:0	0,03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C8:0	0,11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C10:0	nd	0,01	nd	0,01	nd	0,01	nd	nd
C12:0	0,09	0,20	0,16	0,25	0,21	0,19	0,40	0,17
C14:0	2,77	4,31	4,76	4,94	4,66	4,30	6,75	4,02
C14:1	0,01	nd	0,01	nd	nd	0,01	nd	nd
C15:0	0,30	0,43	0,45	0,12	0,09	0,67	0,10	0,33
C15:1	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C16:0	24,13	22,85	23,20	23,83	23,84	23,48	24,04	23,34
C16:1	0,57	0,65	0,61	0,60	0,60	0,47	0,56	0,67
C17:0	0,47	0,77	0,76	0,21	0,19	1,11	0,18	0,54
C17:1	0,08	0,23	0,15	0,06	0,05	0,24	0,05	0,12
C18:0	nd	1,96	1,46	2,48	2,34	1,84	2,50	2,06
C18:1	22,10	22,25	19,92	22,36	20,57	19,50	20,63	22,03
C18:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,10	nd
C18:2	37,16	34,97	36,11	34,35	35,70	35,49	34,03	35,60
C18:3 alfa	11,68	10,71	12,00	10,15	11,03	12,08	9,98	10,47
C20:0	0,15	0,16	0,19	0,17	0,17	0,14	0,18	0,16
C20:1	0,22	0,20	0,12	0,19	0,19	0,19	0,17	0,20
C20:2	0,05	0,04	0,02	0,03	0,04	0,05	0,03	0,04
C22:0	nd	nd	nd	nd	0,02	0,01	nd	nd
C22:1	nd	0,01	nd	nd	nd	nd	nd	0,01
C20:3	0,05	0,08	0,03	0,06	0,09	0,05	0,05	0,07
C20:4	nd	0,01	nd	nd	nd	nd	0,02	nd
C24:0	nd	0,17	0,14	0,19	0,20	0,16	0,22	0,17

[00400] Os experimentos acima descritos indicam a transformação bem sucedida de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) com construtos de transgene de duas tioesterase diferentes (C12 e C14), que envolveram não somente a expressão bem sucedida do transgene, como também o direcionamento correto da proteína expressa para o plastídio e um efeito funcional (a alteração esperada em perfil de lipídeo) como resultado da transformação. O mesmo experimento de transformação foi realizado

utilizando um construto de expressão que contém uma região de codificação de tioesterase C8-10 *Cuphea hookeriana* otimizada por códon (de acordo com a tabela 1) com a sequência de direcionamento de plastídio nativo (SEQ ID NO: 78) não forneceu alteração em perfil de lipídeo. Embora a introdução do transgene C8-10 *Cuphea hookeriana* em *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) tenha sido bem sucedida e confirmada por análise Southern blot, nenhuma alteração em produção de ácido graxo C8 ou C10 foi detectada nos transformantes em comparação com a cepa do tipo selvagem.

**EXEMPLO 5: Geração de cepa de *Prototheca moriformis* com planta exógena TE com sequência de direcionamento de plastídio de alga**

[00401] Para investigar se o uso de sequências de direcionamento de plastídio/cloroplasto de alga melhoraria a expressão de tioesterase de cadeia média (C8-14) e produção de lipídeo de cadeia média subsequente em *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), várias sequências de direcionamento de plastídio de algas putativas foram clonadas de *Chlorella protothecoides* e *Prototheca moriformis*. Constructos de tioesterase com base em tioesterase *Cuphea hookeriana* C8-10, tioesterase *Umbellularia californica* C12, e tioesterase *Cinnamomum camphora* C14 foram feitos utilizando um 5'UTR/promotor de desidrogenase de glutamato *Chlorella sorokiniana* e um 3'UTR reductase de nitrato *Chlorella vulgaris*. As sequências de codificação de tioesterase foram modificadas por remover as sequências de direcionamento de plastídio nativas e substituindo as mesmas com sequências de direcionamento de plastídio dos genomas *Chlorella protothecoides* e *Prototheca moriformis*. Os construtos de expressão de tioesterase e seus números de identificação de sequência correspondentes são listados abaixo. Cada plasmídeo de transformação também continha um construto Neo resistência que era idêntica às aquelas descritas no exemplo 3 acima. Adicionalmente, outro promotor derivado de algas, o promotor Beta-tubulina



*Chlamydomonas reinhardtii*, também foi testado em combinação com os construtos de tioesterase. Sequência de direcionamento de plastídio “nativa” se refere à sequência de direcionamento de plastídio tioesterase de planta superior. Um sumário dos construtos utilizados nesses experimentos é fornecido abaixo:

Nome do construto	Promotor / 5'UTR	Seq de direcionamento ao plastídio	Gene	3'UTR	SEQ ID NO.
Construto 1	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>C. protothecoides</i>	C8-10 TE de <i>Cuphea hookeriana</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 79
Construto 2	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	12 delta ácido graxo desaturase de <i>P. moriformis</i>	C8-10 TE de <i>Cuphea hookeriana</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 80
Construto 3	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	Isopentenil difosfato sintase de <i>P. moriformis</i>	C8-10 TE de <i>Cuphea hookeriana</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 81
Construto 4	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	Isopentenil difosfato sintase de <i>P. moriformis</i>	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 82
Construto 5	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>P. moriformis</i>	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 83
Construto 6	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>C. protothecoides</i>	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 84
Construto 7	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	12 delta ácido graxo desaturase de <i>P. moriformis</i>	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 85
Construto 8	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>C. protothecoides</i>	C14 TE de <i>Cinnamomum camphora</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 86

Construto 9	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Nativo	C8-10 TE de <i>Cuphea hookeriana</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 113
Construto 10	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Isopentenil difosfato sintase de <i>P. moriformis</i>	C8-10 TE de <i>Cuphea hookeriana</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 114
Construto 11	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	12 delta ácido graxo desaturase de <i>P. moriformis</i>	C8-10 TE de <i>Cuphea hookeriana</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 115
Construto 12	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>C. protothecoides</i>	C8-10 TE de <i>Cuphea hookeriana</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 116
Construto 13	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>P. moriformis</i>	C8-10 TE de <i>Cuphea hookeriana</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 117
Construto 14	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Nativo	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 118
Construto 15	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Isopentenil difosfato sintase de <i>P. moriformis</i>	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 119
Construto 16	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	12 delta ácido graxo desaturase de <i>P. moriformis</i>	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 120
Construto 17	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>C. protothecoides</i>	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 121
Construto 18	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>P. moriformis</i>	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 122
Construto 19	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Nativo	C14 TE de <i>Cinnamomum camphora</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 123
Construto 20	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Isopentenil difosfato sintase de <i>P. moriformis</i>	C14 TE de <i>Cinnamomum camphora</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 124
Construto 21	B-tubulina de <i>Chlamydomonas</i>	12 delta ácido graxo desaturase	C14 TE de <i>Cinnamomum</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO:

	<i>reinhardtii</i>	de <i>P. moriformis</i>	<i>camphora</i>		
Construto 22	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>C. protothecoides</i>	C14 TE de <i>Cinnamomum camphora</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 87
Construto 23	B-tubulina de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>P. moriformis</i>	C14 TE de <i>Cinnamomum camphora</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 88

[00402] Cada construto foi transformado em *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) e seleção foi realizada utilizando G418 utilizando os métodos descritos no exemplo 4 acima. Vários clones positivos de cada transformação foram captados e selecionados em relação à presença de transgene tioesterase utilizando análise Southern blotting. A expressão do transgene de tioesterase foi confirmada utilizando RT-PCR. Um subconjunto dos clones positivos (como confirmado por análise de Southern blotting e RT-PCR) de cada transformação foi selecionado e cultivado para análise de perfil de lipídeo. Amostras de lipídeo foram preparadas de amostras de biomassa seca de cada clone e a análise de perfil de lipídeo foi realizada utilizando métodos de hidrólise de ácido descritos no exemplo 4. Alterações em percentagem de área do ácido graxo correspondendo ao transgene de tioesterase foram comparadas com níveis do tipo selvagem, e clones transformados com uma tioesterase com a sequência de direcionamento de plastídio nativo.

[00403] Como mencionado no exemplo 4, os clones transformados com construtos de tioesterase *Cuphea hookeriana* C8-10 com a sequência de direcionamento de plastídio nativo tinham o mesmo nível de ácidos graxos C8 e C10 que o tipo selvagem. Os clones transformados com construtos de tioesterase C8-10 *Cuphea hookeriana* (Constructos 1-3) com sequência de direcionamento de plastídio de algas tiveram um aumento de mais de 10 vezes em ácidos graxos C10 para o construto 3 e aumento de mais de 40 vezes em ácidos graxos C10 para os construtos 1 e 2 (em comparação como tipo selvagem). Os clones transformados com construtos de tioesterase *Umbellularia californica* C12 com a sequência de direcionamento de plastídio

nativo tiveram um aumento modesto de 6-8 vezes em níveis de ácido graxo C12 em comparação com o tipo selvagem. Os clones transformados com os construtos de tioesterase C12 *Umbellularia californica* com os construtos de direcionamento de plastídio de algas (construtos 4-7) tiveram um aumento de mais de 80 vezes em nível de ácido graxo C12 para o construto 4, aproximadamente um aumento de 20 vezes em nível de ácido graxo C12 para o construto 6, aproximadamente um aumento de 10 vezes em nível de ácido graxo C12 para o construto 7 e aproximadamente um aumento de 3 vezes em nível de ácido graxo C12 para o construto 5 (todos comparados com o tipo selvagem). Os clones transformados com tioesterase *Cinamomum camphora* C12 com a sequência de direcionamento de plastídio nativo ou o construto 8 (com a sequência de direcionamento de plastídio desaturase ACP de estearoíla *Chlorella protothecoides*) tiveram aproximadamente um aumento de 2-3 vezes em níveis de ácido graxo C14 em comparação como tipo selvagem. Em geral clones transformados com construtos de tioesterase de sequência de direcionamento de plastídio de algas tiveram um aumento em vezes superior nos níveis de ácido graxo de comprimento de cadeia correspondente do que ao utilizar a sequência de direcionamento de planta superior nativa.

**A. Promotor Beta-tubulina *Chlamydomonas reinhardtii***

[00404] Constructos de expressão de tioesterase heterólogas adicionais foram preparados utilizando o promotor beta-tubulina *Chlamydomonas reinhardtii* em vez do promotor desidrogenase glutamato *C. sorokinana*. Os elementos de construto e sequência dos construtos de expressão são listados acima. Cada construto foi transformado em células hospedeiras de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 utilizando os métodos descritos acima. Perfis de lipídeo foram gerados de um subconjunto de clones positivos para cada construto a fim de avaliar o sucesso e produtividade de cada construto. Os perfis de lipídeo comparam os níveis de ácido graxo (expresso em % de área)

com as células hospedeiras do tipo selvagem. A coluna “média” representa a média numérica do subconjunto de clones positivos. A coluna “amostra” representa o melhor clone positivo que foi selecionado (melhor sendo definido como a amostra que produziu a maior alteração em % de área da produção de ácido graxo de comprimento de cadeia correspondente). A coluna “baixo-elevado” representa a menor % de área e a % de área mais elevada do ácido graxo a partir dos clones que foram selecionados. Os resultados de perfis de lipídeo dos construtos 9-23 são resumidos abaixo.

Constructo 9, <i>Cuphea hookeriana</i> C8-10 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 8:0	0	0,05	0,30	0-0,29
C 10:0	0,01	0,63	2,19	0-2,19
C 12:0	0,03	0,06	0,10	0-0,10
C 14:0	1,40	1,50	1,41	1,36-3,59
C 16:0	24,01	24,96	24,20	
C 16:1	0,67	0,80	0,85	
C 17:0	0	0,16	0,16	
C 17:1	0	0,91	0	
C 18:0	4,15	17,52	3,19	
C 18:1	55,83	44,81	57,54	
C 18:2	10,14	7,58	8,83	
C 18:3 $\alpha$	0,93	0,68	0,76	
C 20:0	0,33	0,21	0,29	
C 24:0	0	0,05	0,11	

Constructo 10, <i>Cuphea hookeriana</i> C8-10 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 8:0	0	0,01	0,02	0-0,03
C 10:0	0	0,16	0,35	0-0,35
C 12:0	0,04	0,05	0,07	0-0,07
C 14:0	1,13	1,62	1,81	0-0,05
C 14:1	0	0,04	0,04	
C 15:0	0,06	0,05	0,05	
C 16:0	19,94	26,42	28,08	
C 16:1	0,84	0,96	0,96	
C 17:0	0,19	0,14	0,13	
C 17:1	0,10	0,06	0,05	
C 18:0	2,68	3,62	3,43	
C 18:1	63,96	54,90	53,91	
C 18:2	9,62	9,83	9,11	
C18:3 $\gamma$	0	0,01	0	
C 18:3 $\alpha$	0,63	0,79	0,73	
C 20:0	0,26	0,35	0,33	
C 20:1	0,06	0,08	0,09	
C 20:1	0,08	0,06	0,07	
C 22:0	0	0,08	0,09	
C 24:0	0,13	0,13	0,11	

Constructo 11, <i>Cuphea hookeriana</i> C8-10 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 8:0	0	0,82	1,57	0-1,87

Constructo 11, <i>Cuphea hookeriana</i> C8-10 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0	3,86	6,76	0-6,76
C 12:0	0,04	0,13	0,20	0,03-0,20
C 14:0	1,13	1,80	1,98	1,64-2,05
C 14:1	0	0,04	0,04	
C 15:0	0,06	0,06	0,06	
C 16:0	19,94	25,60	25,44	
C 16:1	0,84	1,01	1,02	
C 17:0	0,19	0,13	0,11	
C 17:1	0,10	0,06	0,05	
C 18:0	2,68	2,98	2,38	
C 18:1	63,96	51,59	48,85	
C 18:2	9,62	9,85	9,62	
C18:3 $\gamma$	0	0,01	0	
C 18:3 $\alpha$	0,63	0,91	0,92	
C 20:0	0,26	0,29	0,26	
C 20:1	0,06	0,06	0	
C 20:1	0,08	0,06	0,03	
C 22:0	0	0,08	0,08	
C 24:0	0,13	0,06	0	

Constructo 12, <i>Cuphea hookeriana</i> C8-10 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 8:0	0	0,31	0,85	0-0,85
C 10:0	0	2,16	4,35	0,20-4,35
C 12:0	0,04	0,10	0,15	0-0,18
C 14:0	1,13	1,96	1,82	1,66-2,97
C 14:1	0	0,03	0,04	
C 15:0	0,06	0,07	0,07	
C 16:0	19,94	26,08	25,00	
C 16:1	0,84	1,04	0,88	
C 17:0	0,19	0,16	0,16	
C 17:1	0,10	0,05	0,07	
C 18:0	2,68	3,02	3,19	
C 18:1	63,96	51,08	52,15	
C 18:2	9,62	11,44	9,47	
C18:3 $\gamma$	0	0,01	0	
C 18:3 $\alpha$	0,63	0,98	0,90	
C 20:0	0,26	0,30	0,28	
C 20:1	0,06	0,06	0,05	
C 20:1	0,08	0,04	0	
C 22:0	0	0,07	0	
C 24:0	0,13	0,05	0	

Constructo 14, <i>Umbellularia californica</i> C12 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0,01	0,02	0,03	0,02-0,03
C 12:0	0,03	2,62	3,91	0,04-3,91
C 14:0	1,40	1,99	2,11	1,83-2,19
C 16:0	24,01	27,64	27,01	
C 16:1	0,67	0,92	0,92	
C 18:0	4,15	2,99	2,87	
C 18:1	55,83	53,22	52,89	
C 18:2	10,14	8,68	8,41	
C 18:3 $\alpha$	0,93	0,78	0,74	
C 20:0	0,33	0,29	0,27	

Constructo 15, <i>Umbellularia californica</i> C12 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado

Constructo 15, <i>Umbellularia californica</i> C12 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0	0,05	0,08	0-0,08
C 12:0	0,04	8,12	12,80	4,35-12,80
C 13:0	0	0,02	0,03	0-0,03
C 14:0	1,13	2,67	3,02	2,18-3,37
C 14:1	0	0,04	0,03	0,03-0,10
C 15:0	0,06	0,07	0,06	
C 16:0	19,94	25,26	23,15	
C 16:1	0,84	0,99	0,86	
C 17:0	0,19	0,14	0,14	
C 17:1	0,10	0,05	0,05	
C 18:0	2,68	2,59	2,84	
C 18:1	63,96	46,91	44,93	
C 18:2	9,62	10,59	10,01	
C 18:3 $\alpha$	0,63	0,92	0,83	
C 20:0	0,26	0,27	0,24	
C 20:1	0,06	0,06	0,06	
C 20:1	0,08	0,05	0,04	
C 22:0	0	0,07	0,09	
C 24:0	0,13	0,13	0,12	

Constructo 16, <i>Umbellularia californica</i> C12 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0	0,03	0,04	0,02-0,04
C 12:0	0,04	2,43	5,32	0,98-5,32
C 13:0	0	0,01	0,02	0-0,02
C 14:0	1,13	1,77	1,93	1,62-1,93
C 14:1	0	0,03	0,02	0,02-0,04
C 15:0	0,06	0,06	0,05	
C 16:0	19,94	24,89	22,29	
C 16:1	0,84	0,91	0,82	
C 17:0	0,19	0,16	0,15	
C 17:1	0,10	0,06	0,06	
C 18:0	2,68	3,81	3,67	
C 18:1	63,96	53,19	52,82	
C 18:2	9,62	10,38	10,57	
C 18:3 $\alpha$	0,63	0,80	0,77	
C 20:0	0,26	0,35	0,32	
C 20:1	0,06	0,06	0,07	
C 20:1	0,08	0,07	0,08	
C 22:0	0	0,08	0,07	
C 24:0	0,13	0,15	0,14	

Constructo 17, <i>Umbellularia californica</i> C12 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0	0,04	0,07	0,03-0,08
C 12:0	0,04	7,02	14,11	4,32-14,11
C 13:0	0	0,03	0,04	0,01-0,04
C 14:0	1,13	2,25	3,01	1,95-3,01
C 14:1	0	0,03	0,03	0,02-0,03
C 15:0	0,06	0,06	0,06	
C 16:0	19,94	23,20	21,46	
C 16:1	0,84	0,82	0,77	
C 17:0	0,19	0,15	0,14	
C 17:1	0,10	0,06	0,06	
C 18:0	2,68	3,47	2,93	
C 18:1	63,96	50,30	45,17	
C 18:2	9,62	10,33	9,98	

C18:3 $\gamma$	0	0,01	0	
C 18:3 $\alpha$	0,63	0,84	0,86	
C 20:0	0,26	0,32	0,27	
C 20:1	0,06	0,07	0,06	
C 20:1	0,08	0,06	0,06	
C 22:0	0	0,08	0,09	
C 24:0	0,13	0,14	0,13	

Constructo 18, <i>Umbellularia californica</i> C12 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0	0,03	0,05	0,01-0,05
C 12:0	0,04	5,06	7,77	0,37-7,77
C 13:0	0	0,02	0	0-0,03
C 14:0	1,13	2,11	2,39	1,82-2,39
C 14:1	0	0,03	0,03	0,02-0,05
C 15:0	0,06	0,06	0,06	
C 16:0	19,94	24,60	23,95	
C 16:1	0,84	0,86	0,83	
C 17:0	0,19	0,15	0,14	
C 17:1	0,10	0,06	0,05	
C 18:0	2,68	3,31	2,96	
C 18:1	63,96	51,26	49,70	
C 18:2	9,62	10,18	10,02	
C18:3 $\gamma$	0	0,01	0,02	
C 18:3 $\alpha$	0,63	0,86	0,86	
C 20:0	0,26	0,32	0,29	
C 20:1	0,06	0,05	0,05	
C 20:1	0,08	0,07	0,04	
C 22:0	0	0,08	0,08	
C 24:0	0,13	0,13	0,13	

Constructo 19, <i>Cinnamomum camphora</i> C14 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0,02	0,01	0,01	0,01-0,02
C 12:0	0,05	0,27	0,40	0,08-0,41
C 14:0	1,52	4,47	5,81	2,10-5,81
C 16:0	25,16	28,14	28,55	
C 16:1	0,72	0,84	0,82	
C 18:0	3,70	3,17	2,87	
C 18:1	54,28	51,89	51,01	
C 18:2	12,24	9,36	8,62	
C 18:3 $\alpha$	0,87	0,74	0,75	
C 20:0	0,33	0,33	0,31	

Constructo 20, <i>Cinnamomum camphora</i> C14 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0,01	0,01	0,02	0,01-0,02
C 12:0	0,03	0,39	0,65	0,08-0,65
C 13:0	0	0,01	0,01	0,01-0,02
C 14:0	1,40	5,61	8,4	2,1 a 8,4
C 14:1	0	0,03	0,03	0,02-0,03
C 15:0	0	0,06	0,07	
C 16:0	24,01	25,93	25,57	
C 16:1	0,67	0,75	0,71	
C 17:0	0	0,13	0,12	
C 17:1	0	0,05	0,05	
C 18:0	4,15	3,30	3,23	
C 18:1	55,83	51,00	48,48	
C 18:2	10,14	10,38	10,35	
C 18:3 $\alpha$	0,93	0,91	0,88	



C 20:0	0,33	0,35	0,32	
C 20:1	0	0,08	0,08	
C 20:1	0	0,07	0,07	
C 22:0	0	0,08	0,08	
C 24:0	0	0,14	0,13	

Constructo 21, <i>Cinnamomum camphora</i> C14 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0,01	0,01	0,01	0-0,01
C 12:0	0,03	0,10	0,27	0,04-0,27
C 14:0	1,40	2,28	4,40	1,47-4,40
C 16:0	24,01	26,10	26,38	
C 16:1	0,67	0,79	0,73	
C 17:0	0	0,15	0,16	
C 17:1	0	0,06	0,06	
C 18:0	4,15	3,59	3,51	
C 18:1	55,83	53,53	50,86	
C 18:2	10,14	10,83	11,11	
C 18:3 $\alpha$	0,93	0,97	0,87	
C 20:0	0,33	0,36	0,37	
C 20:1	0	0,09	0,08	
C 20:1	0	0,07	0,07	
C 22:0	0	0,09	0,09	

Constructo 22, <i>Cinnamomum camphora</i> C14 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0,01	0,02	0,02	0,02-0,02
C 12:0	0,03	1,22	1,83	0,59-1,83
C 13:0	0	0,02	0,03	0,01-0,03
C 14:0	1,40	12,77	17,33	7,97-17,33
C 14:1	0	0,02	0,02	0,02-0,04
C 15:0	0	0,07	0,08	
C 16:0	24,01	24,79	24,22	
C 16:1	0,67	0,64	0,58	
C 17:0	0	0,11	0,10	
C 17:1	0	0,04	0,04	
C 18:0	4,15	2,85	2,75	
C 18:1	55,83	45,16	41,23	
C 18:2	10,14	9,96	9,65	
C 18:3 $\alpha$	0,93	0,91	0,85	
C 20:0	0,33	0,30	0,30	
C 20:1	0	0,07	0,06	
C 20:1	0	0,06	0,05	
C 22:0	0	0,08	0,08	

Constructo 23, <i>Cinnamomum camphora</i> C14 TE				
Ácido graxo	tipo selvagem	Média	Amostra	baixo/elevado
C 10:0	0,01	0,01	0,02	0-0,02
C 12:0	0,05	0,57	1,08	0,16-1,08
C 13:0	0	0,02	0,02	0-0,02
C 14:0	1,45	7,18	11,24	2,96-11,24
C 14:1	0,02	0,03	0,03	0,02-0,03
C 15:0	0,06	0,07	0,07	
C 16:0	24,13	25,78	25,21	
C 16:1	0,77	0,72	0,66	
C 17:0	0,19	0,13	0,11	
C 17:1	0,08	0,05	0,04	
C 18:0	3,53	3,35	3,12	
C 18:1	56,15	49,65	46,35	
C 18:2	11,26	10,17	9,72	

C 18:3 $\alpha$	0,84	0,95	0,83	
C 20:0	0,32	0,34	0,32	
C 20:1	0,09	0,08	0,09	
C 20:1	0,07	0,05	0,06	
C 22:0	0,07	0,08	0,08	
C 24:0	0,13	0,13	0,12	

[00405] Os construtos 9-13 eram vetores de expressão contendo o construto tioesterase *Cuphea hookeriana* C8-10, Como pode ser visto nos sumários de dados acima, os melhores resultados foram vistos com o construto 11, com o ácido graxo C8 de amostra sendo 1,57% de área (em comparação com 0 em tipo selvagem) e ácido graxo C10 sendo 6,76 % de área (em comparação com 0 em tipo selvagem). Houve também um aumento modesto em ácidos graxos C12 (aproximadamente aumento de 2-5 vezes). Embora a sequência de direcionamento de plastídio nativo não produzisse alteração quando sob o controle do promotor desidrogenase de glutamato *C. sorokinana*, o mesmo construto de expressão acionado pelo promotor Beta-tubulina *C. reinhardtii* produziu alterações significativas em ácidos graxos C8-10 na célula hospedeira. Isso é evidência adicional das idiossincrasias de expressão heteróloga de tioesterases em espécies de *Prototheca*. Todos os clones contendo o construto de tioesterase C8-10 de promotor Beta-tubulina *C.reinhardtii* tiveram aumentos maiores em ácidos graxos C8-10 do que os clones contendo o construto de tioesterase C8-10 de promotor de desidrogenase glutamato *C. sorokinana*. Os dados de perfil de lipídeo para o construto 13 não foram obtidos e, portanto, não são incluídos acima.

[00406] Os construtos 14-18 eram vetores de expressão contendo o construto tioesterase C12 *Umbellularia californica*. Como pode ser visto nos sumários de dados acima, os melhores resultados foram vistos com os construtos 15 (sequência de direcionamento de plastídio de sintase difosfato isopentenil *P. moriformis*) e 17 (sequência de direcionamento de plastídio desaturase ACP estearoíla *C. protothecoides*). A maior alteração em produção de ácido graxo C12 foi vista com o construto 17, com níveis de ácidos graxos C12 de até 14,11% em área, em comparação com 0,04% em área em tipo

selvagem. Alterações modestas (aproximadamente 2 vezes) foram também vistas com níveis de ácido graxo C14, Quando comparado com os mesmos construtos com o promotor desidrogenase glutamato *C. sorokinana*, as mesmas tendências eram verdadeiras com o promotor B.tubulin *C. reinhardtii* – as sequências de direcionamento de plastídio de sintase difosfato isopentenil P. moriformis e desaturase ACP de estearoíla *C. protothecoides* produziram a maior alteração em níveis de ácido graxo C12 com os dois promotores.

[00407] Constructos 19-23 eram vetores de expressão contendo o construto de tioesterase C14 *Cinnamomum camphora*. Como pode ser visto nos sumários de dados acima, os melhores resultados foram vistos com os construtos 22 e construto 23, A maior alteração em produção de ácido graxo C14 foi vista com o construto 22, com níveis de ácido graxo C14 de até 17,35% de área (quando os valores para C140 e C141 são combinados), em comparação com 1,40% em tipo selvagem. Alterações em ácidos graxos C12 foram também vistas (5-60 vezes). Quando comparado com os mesmos construtos com o promotor de desidrogenase glutamato *C. sorokinana*, as mesmas tendências eram verdadeiras com o promotor Beta-tubulina *C. reinhardtii* – as sequências de direcionamento de plastídio desaturase ACP estearoíla P. moriformis e desaturase ACP estearoíla *C. protothecoides* produziram a maior alteração em níveis de ácido graxo C14 com os dois promotores. Compativelmente com todos os construtos de expressão de tioesterase, os construtos de promotor Beta-tubulina *C. reinhardtii* produziram maiores alterações em níveis de ácido graxo C8-14 do que a desidrogenase glutamato *C. sorokiniana*.

[00408] Dois clones positivos do construto 22 foram selecionados e cultivados sob pressão seletiva elevada (50 mg/L G418). Após 6 dias em cultura, os clones foram colhidos e seu perfil de lipídeo foi determinado utilizando os métodos descritos acima. Os dados de perfil de lipídeo são resumidos abaixo e expressos em % de área.

[00409]

Constructo 22 clones + 50mg/L G418		
Ácido graxo	Constructo 22 A	Constructo 22 B
C 12:0	3,21	3,37
C 14:0	27,55	26,99
C 16:0	25,68	24,37
C 16:1	0,99	0,92
C 18:0	1,37	1,23
C 18:1	28,35	31,07
C 18:2	11,73	11,05
C 18:3 $\alpha$	0,92	0,81
C 20:0	0,16	0,17

[00410] Os dois clones, quando crescidos sob pressão seletiva elevada constante, produziram uma quantidade aumentada de ácidos graxos C14 e C12, aproximadamente dobram os níveis vistos com o construto 22 acima. Esses clones forneceram mais de 30% de área de ácidos graxos C12-14, em comparação com 1,5% de área de ácidos graxos C12-14 vistos em células do tipo selvagem.

#### **Exemplo 6: expressão heteróloga de *Cuphea palustris* e *Ulmus americana* Tioesterase em *Prototheca***

[00411] Dado o sucesso dos tioesterases de expressão heteróloga acima descritos em espécie de *Prototheca*, cassetes de expressão contendo sequências otimizadas por códon (de acordo com a Tabela 1) que codificam tioesterases ACP-acila graxa de *Cuphea palustris* e *Ulmus americana* foram construídos e descritos abaixo.

Nome do construto	Promotor/5' UTR	Seq de direcionamento ao plástídeo	Gene	3'UTR	SEQ ID NO:
Construto 27	B-tubulina de <i>C. reinhardtii</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>C. protothecoides</i>	Tioesterase de <i>Cuphea palustris</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 107

[00412] *Ulmus americana* (sequência de codificação otimizada por códon) pode ser inserida no cassete de expressão. A sequência de codificação otimizada por códon sem a sequência de direcionamento de plástídeo nativo para a tioesterase *Ulmus americana* é listada como SEQ ID NO: 108 e pode ser fundida em qualquer sequência de direcionamento de plástídeo desejado e

elemento de expressão (isto é, promotor/5' UTR e 3'UTR).

[00413] Esses cassetes de expressão podem ser transformados na espécie *Prototheca* utilizando os métodos descritos acima. Clones positivos podem ser selecionados com a inclusão de um gene de resistência a antibiótico (por exemplo, neoR) no construto de expressão e selecionado em meios/placas contendo G418, Clones positivos podem ser confirmados inutilizando ensaios Southern blot com sondas específicas para a região de codificação de tioesterase heteróloga e expressão do construto pode ser também confirmada utilizando RT-PCR e iniciadores específicos para a região de codificação da tioesterase heteróloga. Confirmação secundária de clones positivos pode ser obtida por procurar alterações em níveis de ácidos graxos no perfil de lipídeo da célula hospedeira. Como visto nos exemplos acima, a expressão heteróloga em espécie de *Prototheca* de tioesterase pode ser idiossincrática para a tioesterase específica. Elementos promotores e sequências de direcionamento de plastídio (e outros elementos reguladores de expressão) podem ser intercambiados até que a expressão da tioesterase (e o aumento subsequente no ácido graxo correspondente) atinja um nível desejado.

#### **EXEMPLO 7: Transformantes duais – expressão simultânea de duas proteínas heterólogas**

[00414] A cepa de microalgas *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) foi transformada utilizando os métodos revelados acima com um construto de expressão que contém o gene de invertase de sacarose de levedura suc2 codificando a forma secretada da invertase *S. cerevisiae*. A expressão bem sucedida desse gene e direcionamento no periplasma resulta na capacidade da célula hospedeira crescer em (e utilizar sacarose) como uma fonte de carbono única em condições heterotróficas (como demonstrado no exemplo 3 acima). O segundo conjunto de genes expressos são tioesterases que são responsáveis pela clivagem da fração de acila a partir da proteína portadora de acila.

Especificamente, tioesterases de *Cuphea hookeriana* (uma tioesterase que prefere C8-10), *Umbellularia californica* (uma tioesterase que prefere C12) e *Cinnamomum camphora* (uma tioesterase que prefere C14). Esses cassetes de expressão de tioesterase foram clonados como fusões com seqüências de direcionamento de plastídio de microalgas terminais-N de *Prototheca moriformis* ou *Chlorella protothecoides*, que foram mostrados (nos exemplos acima) como sendo mais ideais do que as seqüências de direcionamento de plastídio de planta superior nativas. A expressão bem sucedida dos genes de tioesterase e o direcionamento no plastídio resultaram em alterações mensuráveis nos perfis de ácido graxo na célula hospedeira. Essas alterações em perfis são compatíveis com a especificidade enzimática ou preferência de cada tioesterase. Abaixo está um sumário de construções de expressão dual que foram montadas e transformadas em *Prototheca moriformis* (UTEX 1435). Cada construto continha o gene de levedura *suc2* sob o controle do promotor/5'UTR  $\beta$ -tubulina *C.reinhardtii* e continha 3'UTR de reductase de nitrato *C. vulgaris* e uma tioesterase de planta superior com uma seqüência de direcionamento de plastídio de microalgas substituindo a seqüência nativa sob o controle de 5'UTR de desidrogenase de glutamato *C. sorokiniana* e continha 3'UTR de reductase de nitrato *C. vulgaris*. Abaixo está um sumário da porção de tioesterase das construções que foram montadas e transformadas em *Prototheca moriformis* (UTEX 1435). O cassete de expressão dual inteiro com o gene *suc2* e o gene de tioesterase são listados na Listagem de identificação de seqüência.

Nome da construção	Promotor/5'UTR	Seq. Direcionamento ao plastídio	Gene	3'UTR	SEQ ID NO:
Construto 24	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>C. protothecoides</i>	C8-10 TE de <i>Cuphea hookeriana</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 109
Construto 25	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	Isopentenil difosfato sintase de <i>P.</i>	C12 TE de <i>Umbellularia californica</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 110

		<i>moriformis</i>			
Construto 26	Glutamato desidrogenase de <i>C. sorokiniana</i>	Estearoíla ACP desaturase de <i>C. protothecoides</i>	C14 TE de <i>Cinnamomum camphora</i>	Nitrato redutase de <i>C. vulgaris</i>	SEQ ID NO: 111

[00415] Constructos de expressão dual similares com os cassetes de tioesterase descritos no exemplo 5 (por exemplo, sob o controle de um promoter diferente como 5'UTR/promoter Beta-tubulina *C. reinhardtii*) também podem ser geradas utilizando métodos de biologia molecular padrão e métodos descritos aqui.

[00416] Clones positivos contendo cada das construções de expressão foram selecionados utilizando sua capacidade de crescer em placas contendo sacarose, onde sacarose é a fonte de carbono única, como o fator de seleção. Um subconjunto desses clones positivos de cada transformação de construto foi selecionado e a presença do construto de expressão foi confirmada utilizando ensaios Southern blot. A função da invertase de sacarose de levedura foi também confirmada utilizando um ensaio de hidrólise de sacarose. Clones positivos foram selecionados e crescidos em meios contendo sacarose como a fonte de carbono única em uma concentração de partida de 40 g/L. Um controle negativo de *Prototheca moriformis* do tipo selvagem (UTEX 1435) crescido em meio contendo glicose como a fonte de carbono única na mesma concentração de partida de 40 g/L foi também incluída. A utilização de sacarose foi medida durante todo o curso do experimento por medir o nível de sacarose no meio utilizando um Analisador de Bioquímica YSI 2700 com uma membrana específica de sacarose. Após seis dias em cultura, as culturas foram colhidas e processadas para perfil de lipídeo utilizando os mesmos métodos como descrito acima. Os resultados de perfil de lipídeo são resumidos abaixo na tabela 17 e são mostrados em % de área.

Tabela 17. Perfis de lipídeos de transformantes duais com invertase de sacarose suc2 e tioesterase

Ácido graxo	Wt	C24 A	C24 B	C24 C	C25 A	C25 B	C25 C	C26 A	C26 B	C26 C
C 10:0	0,01	0,03	0,04	0,08	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0
C 12:0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,28	0,40	0,10	0,04	0,04	0,13
C 14:0	1,6	1,55	1,53	1,56	1,59	1,59	1,60	1,65	1,56	2,69
C 14:1	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
C 15:0	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
C 16:0	29,2	29,1	29,0	28,6	28,9	28,6	29,0	28,8	29,5	27,5
C 16:1	0,86	0,80	0,79	0,82	0,77	0,81	0,82	0,79	0,79	0,86
C 17:0	0,1	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09
C 17:1	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
C 18:0	3,26	3,33	3,37	3,27	3,36	3,28	3,18	3,33	3,36	3,03
C 18:1	54,5	53,9	54,1	53,9	53,5	53,7	53,5	54,2	53,9	52,7
C 18:2	8,72	9,35	9,22	9,45	9,68	9,65	9,87	9,31	9,06	10,8
C 18:3 alfa	0,63	0,71	0,69	0,73	0,74	0,73	0,75	0,71	0,66	0,83
C 20:0	0,29	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32	0,31	0,32	0,31	0,29

[00417] Todos os clones positivos selecionados para o ensaio de utilização de sacarose foram capazes de hidrolisar a sacarose no meio e ao término do período de cultura de 6 dias, não houve níveis mensuráveis de sacarose nos meios. Esses dados, além do uso bem sucedido de sacarose como uma ferramenta de seleção para clones positivos, indica que o gene de invertase de sacarose *suc2* de levedura exógena foi atingido corretamente e expresso nos transformantes. Como mostrado na Tabela 17 acima, os clones que expressam o construto 24 (tioestearase C8-10) tiveram um aumento mensurável em ácidos graxos C10 (tão elevado quanto um aumento de oito vezes). De modo semelhante houve aumentos mensuráveis em clones que expressam o construto 25 (tioesterase C12) e construto 26 (tioesterase C14) nos ácidos graxos de cadeia média correspondentes. Tomados juntos, os dados mostram a expressão simultânea bem sucedida em *Prototheca moriformis* duas proteínas recombinantes (por exemplo, invertase de sacarose e uma tioesterase ACP-acila de ácido graxo), as quais conferem ambas as alterações fenotípicas úteis e quantificáveis no organismo hospedeiro.

#### **EXEMPLO 8: efeitos de glicerol sobre a produção de ácido graxo C10-C14 em transformantes de tioesterase C14**

[00418] Clones de todas as transformações de tioesterase foram selecionados e adicionalmente avaliados. Um clone expressando Construção 8 (*Cinnamomum camphora* C15 TE) foi cultivado heterotroficamente utilizando



fontes de carbono diferentes; glicose somente, frutose somente e glicerol somente. A condição de glicose somente resultou em crescimento de células mais elevado e produção total de lipídeos quando comparado com as condições de frutose somente e glicerol somente. Entretanto, a proporção de ácidos graxos C12-14 produzida na condição de glicerol somente foi duas vezes mais elevada do que aquela obtida na condição de glicose somente.

**EXEMPLO 9: Expressão de invertase de *Arabidopsis thaliana* em *Prototheca moriformis***

[00419] A cepa de microalgas *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) foi transformada utilizando métodos descritos acima, com um construto de expressão que contém uma invertase associada à parede de célula otimizada por códon (de acordo com a Tabela 1) a partir de *Arabidopsis thaliana*. A sequência de invertase *Arabidopsis* foi modificada para incluir os 39 aminoácidos terminais-N de invertase de levedura (proteína SUC2) para assegurar direcionamento eficiente no ER e finalmente periplasma. Para auxiliar a detecção, um epítipo Flag foi adicionado à extremidade-C da proteína recombinante. O transgene foi clonado em um vetor de expressão com uma região 5'UTR/promotor de desidrogenase de glutamato *Chlorella sorokiniana* e uma região 3'UTR de reductase nitrato *Chlorella vulgaris*. A sequência de DNA desses cassetes de transgene é listada como SEQ ID NO: 89 e a sequência de aminoácidos traduzida é listada como SEQ ID NO: 90. Clones positivos foram classificados e selecionados utilizando placas/meios contendo sacarose. Um subconjunto dos clones positivos foi confirmado em relação à presença do transgene e expressão de invertase utilizando análise Southern blot e análise Western blot para a invertase marcada com Flag. A partir dessas seleções, 10 clones positivos foram escolhidos para ensaios de utilização de sacarose e produtividade de lipídeo. Todos os 10 clones foram cultivados em meios contendo sacarose como a fonte de carbono única e um transformante de invertase suc2 de controle positivo foi também incluído. O

controle negativo, *Prototheca moriformis* do tipo selvagem, também foi cultivado, porém em meios contendo glicose. Após seis dias, as células foram colhidas e secas e a percentagem total de lipídeos por peso de célula seca foi determinada. O meio também foi analisado em relação a consumo total de sacarose.

[00420] Todos os dez clones positivos foram capazes de hidrolisar sacarose, entretanto, a maioria dos clones cresceu aproximadamente metade bem como o tipo selvagem ou o transformante de invertase de levedura *suc2* de controle positivo como determinado por peso de célula seca no término do experimento. Similarmente, todos os dez clones positivos produziram aproximadamente metade da quantidade total de lipídeo quando comparado com o transformante de controle positivo ou tipo selvagem.

**EXEMPLO 10: Expressão heteróloga de invertase de levedura (*suc2*) em *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora* e *Prototheca zopfii***

[00421] Para testar a aplicabilidade geral dos métodos de transformação para uso na espécie do gênero *Prototheca*, três outras espécies de *Prototheca* foram selecionadas: (*prtotheca krugani* (UTEX 329), *Prototheca stagnora* (UTEX 1442) e *Prototheca zopfi* (UTEX 1438). Essas três cepas foram cultivadas no meio e condições descritas no exemplo 1 e seus perfis foram determinados utilizando os métodos descritos acima. Um sumário dos perfis de lipídeo das três cepas de *Prototheca* é resumido abaixo em % de área.

Ácido graxo	<i>P. krugani</i> (UTEX 329)	<i>P. stagnora</i> (UTEX 1442)	<i>P. zopfii</i> (UTEX 1438)
C 10:0	0,0	0,0	0,0
C 10:1	0,0	0,0	0,0
C 12:0	1,5	0,8	2,1
C 14:0	1,2	0,9	1,7
C 16	15,1	17,1	19,7
C 18:0	3,3	4,1	5,4
C 18:1	66,0	61,5	53,8
C 18:2	12,9	15,6	17,3

[00422] Essas três cepas foram transformadas com um cassete de

expressão de invertase de levedura (suc2) (SEQ ID NO: 58) utilizando os métodos descritos no exemplo 3 acima. Esse cassete de expressão de invertase de levedura (suc2) foi demonstrado funcionar em *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) acima no exemplo 3. Os transformantes foram selecionados utilizando meio/placas contendo sacarose. Um subconjunto dos clones positivos para cada espécie de *Prototheca* foi selecionado e a presença do transgene foi confirmada por análise Southern blot. Dez dos clones positivos confirmados de cada espécie foram selecionados para análise de hidrólise de sacarose e produtividade de lipídeo. Os clones foram cultivados em meio contendo sacarose como a fonte de carbono única e comparados com sua cópia do tipo selvagem crescida em glicose. Após 6 dias, as culturas foram colhidas e secas e a percentagem total de lipídeo e peso de célula seca foi avaliado. Os meios de cada cultura foram também analisados em relação à hidrólise de sacarose utilizando um Analisador de Bioquímica YSI2700 para teor de sacarose durante o curso do experimento. Clones de todas as três espécies foram capazes de hidrolisar sacarose, com transformantes *Prototheca stagnora* e *Prototheca zopfii* sendo capazes de hidrolisar sacarose mais eficientemente do que *Prototheca krugani*. A produção total de lipídeos e peso de célula seca das três espécies de transformantes foram comparáveis com sua cópia de tipo selvagem cultivada em glicose. Esses dados demonstram a transformação bem sucedida e genes exógenos de expressão em múltiplas espécies do gênero *Prototheca*.

#### **EXEMPLO 11: Promotores derivados de algas e genes para uso em microalgas**

##### **A. Sequências de promotor e 5'UTR de *Chlorella protothecoides***

[00423] Uma biblioteca de cDNA foi gerada de *Chlorella protothecoides* cultivado de forma mixotrófica (UTEX 250) utilizando técnicas padrão. Com base nas seqüências de cDNA, iniciadores foram

projetados em certos genes de housekeeping conhecidos para “andar” à montante das regiões de codificação utilizando um kit de Andar DNA de Seegene (Rockville, MD). As seqüências isoladas incluem uma actina (SEQ ID NO: 1) e fator de alongamento-1a (EF1a) (SEQ ID NO: 32) promotor/UTR, os quais contêm ambos introns (como mostrado em letra minúscula) e exons (letra maiúscula em itálico) e o sítio de partida previsto (em negrito) e dois elementos UTR/promotor de beta-tubulin: Isoforma A (SEQ ID NO: 33) e Isoforma B (SEQ ID NO: 34).

**B. Seqüências de direcionamento de plastídio e Enzima de biossíntese de lipídeo de *C. protothecoides***

[00424] Da biblioteca de cDNA descrita acima, três proteínas de codificação de cDNAs funcionais em metabolismo de lipídeo em *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) foram clonadas utilizando os mesmos métodos como descrito acima. As seqüências de aminoácidos e nucleotídeos para uma desaturase ACP acila (SEQ ID NOS: 45 e 46) e duas sintases de difosfato de geranila geranila (SEQ ID Nos: 47-50) são incluídas na Listagem de seqüências abaixo. Adicionalmente, três cDNAs com seqüências de sinal putativo de direcionamento ao plastídio foram também clonados. As seqüências de aminoácido e nucleotídeo para uma desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (SEQ ID Nos: 51 e 52), uma proteína complexa que desprende oxigênio OEE33 (SEQ ID NOS: 53 E 53) e uma protease Clp (SEEQ ID nos: 55 e 56) são incluídas na Listagem de seqüências abaixo. A seqüência de direcionamento de plastídio putativa foi sublinhada tanto na seqüência de nucleotídeos como de aminoácidos. As seqüências de direcionamento de plastídio podem ser utilizadas para direcionar os produtos de transgenes para o plastídio de micróbios, como enzimas de modificação de lipídeo.

**EXEMPLO 12: promotores/5'UTR que são responsivos a nitrogênio a partir de *Prototheca moriformis***

[00425] Uma biblioteca de cDNA foi gerada de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) utilizando técnicas padrão. As células *Prototheca moriformis* foram crescidas por 48 horas sob condições repletas de nitrogênio. A seguir um inoculo a 5% (v/v) foi então transferido para abaixar nitrogênio e as células foram colhidas a cada 24 horas por sete dias. Após aproximadamente 24 horas em cultura, o fornecimento de nitrogênio no meio estava totalmente esgotado. As amostras coletadas foram imediatamente congeladas utilizando gelo seco e isopropanol. O RNA total foi subsequenteemente isolado das amostras de pelota de célula congelada e uma porção de cada amostra foi retida em reserva para estudos RT-PCR. O resto do RNA total colhido das amostras foi submetido à seleção poliA. Quantidades equimolares de RNA selecionado por poliA de cada condição foram então agrupadas e utilizadas para gerar uma biblioteca de cDNA em pcDNA3,0 vetor (Invitrogen). Aproximadamente 1200 clones foram aleatoriamente pegos da biblioteca de cDNA agrupada resultante e submetidos a seqüenciamento nas duas fitas. Aproximadamente 68 cDNAs diferentes foram selecionados entre essas 1200 seqüências e utilizados para projetar iniciadores específicos de cDNA para uso em estudos de RT-PCR em tempo real.

[00426] O RNA isolado das amostras de pelota de célula que foram retidas em reserva foi utilizado como substrato nos estudos de RT-PCR em tempo real utilizando os conjuntos de iniciador específico de cDNA gerados acima. Esse RNA reservado foi convertido em cDNA e utilizado como substrato para RT-PCR para cada dos 68 conjuntos de iniciador específico de gene. Números C<sub>T</sub> ou ciclo limite foram utilizados para indicar abundância de transcrito relativa para cada dos 68 cDNAs em cada amostra de RNA coletada durante todo o curso de tempo. cdDNAs que mostram aumento significativo (maior do que três vezes) entre condições repletas de nitrogênio e com nitrogênio esgotado foram flagged como genes em potencial cuja expressão foi regulada ascendentemente por depleção de nitrogênio. Como discutido no

relatório descritivo, limitação/depleção de nitrogênio é um indutor conhecido de lipogênese em microorganismos oleaginosos.

[00427] Para identificar seqüências de promotores putativos/ 5'UTR dos cDNAs cuja expressão foi regulada ascendentemente durante limitação / depleção de nitrogênio, o DNA total foi isolado de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) crescida sob condições repletas de nitrogênio e foram então submetidas a seqüenciamento utilizando tecnologia de seqüenciamento 454 (Roche). cDNAs flagged como sendo regulados ascendentemente pelos resultados de RT-PCR acima foram comparados utilizando BLAST contra contigs montados que se originam das 454 leituras de seqüenciamento genômico. As extremidades 5' de cDNAs foram mapeadas para contigs específicos, e onde possível maior do que 500 bp de DNA de flanquear 5' foi utilizado para identificar putativamente promotores/UTRs. A presença de promotores/5'UTR foi subsequente confirmada e clonada utilizando amplificação PCR de DNA genômico. Extremidades 5' de cDNA individuais foram utilizadas para projetar iniciadores 3' e extremidade 5' das 454 montagens de contig foram utilizadas para projetar iniciadores específicos de gene 5'.

[00428] Como uma primeira seleção, um do promotor putativo, o promotor/5'UTR isolado de Aat2 (transportador de amônio, SEQ ID NO: 99) foi clonado no construto de tioesterase *Cinnamomum camphora* C14 com o peptídeo de trânsito de desaturase ACP estearoíla *Chlorella protothecoides* descrito no exemplo 5, acima, substituindo o promotor de desidrogenase glutamato *C. sorokinana*. Esse construto é listado como SEQ ID NO: 112. Para testar o promotor putativo, o construto de tioesterase é transformado em células de *Prototheca moriformis* para confirmar a atividade efetiva de promotor por selecionar para um aumento em ácidos graxos C14/C12 sob condições de nitrogênio baixo/sem nitrogênio, utilizando os métodos descritos acima. Teste similar dos promotores regulados por nitrogênio putativo

isolados da seleção genômica/cDNA pode ser feito utilizando os mesmos métodos.

[00429] Outros promotores regulados por nitrogênio putativos/5'UTRs que foram isolados da seleção genômica/cDNA foram:

Promotor/5'UTR	SEQ ID NO.	Aumento em vezes
FatB/A promotor/5'UTR	SEQ ID NO: 91	n/a
NRAMP promotor transportador de metal/5'UTR	SEQ ID NO: 92	9,65
Flap promotor de proteína associado à Flagellar/UTR	SEQ ID NO: 93	4,92
SulfRed promotor de reductase de sulfito/5'UTR	SEQ ID NO: 94	10,91
SugT promotor transportador de açúcar/5'UTR	SEQ ID NO: 95	17,35
Amt03-promotor 03 transportador de amônio/5'UTR	SEQ ID NO: 96	10,1
Amt02- promotor 02 transportador de amônio /5'UTR	SEQ ID NO: 97	10,76
Aat01- promotor 01 transportador de aminoácido /5'UTR	SEQ ID NO: 98	6,21
Aat02- promotor 02 transportador de aminoácido 5'UTR	SEQ ID NO: 99	6,5
Aat03- promotor 03 transportador de aminoácido /5'UTR	SEQ ID NO: 100	7,87
Aat04- promotor 04 transportador de aminoácido /5'UTR	SEQ ID NO: 101	10,95
Aat05- promotor 05 transportador de aminoácido /5'UTR	SEQ ID NO: 102	6,71

[00430] O aumento em vezes se refere ao aumento em vezes em abundância de cDNA após 24 horas de cultura em meio de nitrogênio baixo.

### **EXEMPLO 13: recombinação homóloga em espécie de *Prototheca***

[00431] Recombinação homóloga de transgenes tem várias vantagens em relação aos métodos de transformação descritos nos exemplos acima. Primeiramente, a introdução de transgenes sem recombinação homóloga pode ser imprevisível porque não há controle sobre o número de cópias do plasmídeo que é introduzido na célula. Além disso, a introdução de transgenes sem recombinação homóloga pode ser instável porque o plasmídeo pode permanecer episomal e é perdido durante divisões subsequentes de células. Outra vantagem de recombinação homóloga é a capacidade de “abater” alvos de gene, introduzir marcadores de epítipo, comutar promotores de genes endógenos e de outro modo alterar alvos de gene (por exemplo, a introdução de mutações de ponto).

[00432] Dois vetores foram construídos utilizando uma região específica do genoma *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), designada KE858, KE858 é um fragmento genômico de 1,3 kb, que abrange parte da região de codificação para uma proteína que compartilha homologia com a

família de RNA de transferência (tRNA) de proteínas. Southern blots mostraram que a sequência KE858 está presente em uma única cópia no genoma de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435). O primeiro tipo de vetor que foi construído, designado SZ725 (SEQ ID NO: 103) consistiu no fragmento KE858 de 1,3 kb inteiro clonado em uma espinha dorsal de vetor pUC198 que também contém o gene de invertase de levedura otimizada (suc2) utilizado no exemplo 3 acima. O fragmento KE858 contém um sítio SnaB1 exclusivo que não ocorre em nenhum outro lugar no construto de “targeting”. O segundo tipo de vetor que foi construído, destinado SYZ726 (SEQ ID NO: 126), consistiu na sequência KE858 que tinha sido rompida pela inserção do gene de invertase de levedura (suc2) no sítio SnaBI na sequência genômica KE858. O fragmento de DNA inteiro contendo as sequências KE858 que flanqueiam o gene de invertase de levedura pode ser excisado da espinha dorsal de vetor por digestão com EcoRI, que corta em qualquer extremidade da região KE858.

[00433] Os dois vetores foram utilizados para orientar recombinação homóloga do gene de invertase de levedura (suc2) par a região KE858 correspondente do genoma *Prototheca moriformis* (UTEX 1435). As extremidades de DNA lineares homólogas à região genômica que estava sendo alvo para recombinação homóloga foram expostas por digestão do construto de vetor SZ725 com SnaB1 e construto de vetor SZ725 com EcoRI. Os construtos de vetor digeridas foram então introduzidas em culturas de *Prototheca moriformis* utilizando métodos descritos acima no exemplo 3. Transformantes de cada construto de vetor foram então selecionados utilizando placas de sacarose. Dez transformantes clonalmente puros independentes de cada transformação de vetor foram analisados para recombinação bem sucedida do gene de invertase de levedura no local genômico desejado (utilizando Southern blots) e para estabilidade de transgene.



[00434] A análise Southern blot dos transformantes SZ725 mostrou que 4 dos 10 transformantes pegos para análise continham as faixas recombinantes previstas, indicando que um único evento de cruzamento tinha ocorrido entre as seqüências KE858 no vetor e as seqüências KE858 no genoma. Ao contrário, todos os dez dos transformantes SZ726 continham as faixas recombinantes previstas, indicando que eventos de cruzamento duplo tinham ocorrido entre o fragmento EcoRI de pSZ726 portando a seqüência KE858 que flanqueia o transgene de invertase de levedura e a região KE858 correspondente do genoma.

[00435] A expressão de invertase de sacarose e estabilidade de transgene foram avaliadas por cultivar os transformantes por mais de 15 gerações na ausência de seleção. Os quatro transformantes SZ725 e os dez transformantes SZ726 que eram positivos para o transgene por Southern blotting foram selecionados e 48 colônias únicas de cada dos transformantes foram cultivadas em série: primeiramente sem seleção em meio contendo glicose e então com seleção em meio contendo sacarose como a fonte de carbono única. Todos os dez transformantes SZ726 (100%) retiveram sua capacidade de crescer em sacarose após 15 gerações, ao passo que aproximadamente 97% dos transformantes SZ725 retiveram sua capacidade de crescer em sacarose após 15 gerações. Transgenes introduzidos por um evento de cruzamento duplo (vetor SZ726) têm estabilidade extremamente elevada em relação a duplicações de geração. Ao contrário, transgenes introduzidos por um evento de cruzamento único (vetor SZ725) podem resultar em alguma instabilidade durante duplicações de geração porque cópias tandem dos transgenes foram introduzidas, as regiões homólogas repetidas flanqueando os transgenes podem recombinar e cortar o DNA transgênico localizado entre as mesmas.

[00436] Esses experimentos demonstram o uso bem sucedido de recombinação homóloga para gerar transformantes de *Prototheca* contendo

um gene de invertase de sacarose heterólogo que é estavelmente integrado nos cromossomos nucleares do organismo. O sucesso da recombinação homóloga permite que outras alterações genômicas em *Prototheca*, incluindo deleções de gene, mutações de ponto e marcação de epítipo de um produto de gene desejado. Esses experimentos também demonstram o primeiro sistema documentado para recombinação homóloga no genoma nuclear de uma microalga eucariótica.

**A. Uso de recombinação homóloga para nocautear um gene de *Prototheca moriformis* endógeno**

[00437] Na seleção genômica/cDNA de *Prototheca moriformis* descrita no exemplo 11 acima, um cDNA desaturase ACP estearoíla endógeno (SAPD) foi identificado. Enzimas de desaturase ACP de estearoíla é parte da via de síntese de lipídeo e funcionam para introduzir ligações duplas nas cadeias de acila graxa. Em alguns casos, pode ser vantajoso nocautear ou reduzir a expressão de enzimas de via de lipídeo para alterar um perfil de ácido graxo. Um construto de recombinação homóloga foi criado para avaliar se a expressão de uma enzima de desaturase ACP estearoíla endógena pode ser reduzida (ou nocauteada) e se uma redução correspondente em ácidos graxos insaturados pode ser observada no perfil de lipídeo da célula hospedeira. Uma sequência de codificação de aproximadamente 1,5 kb de um gene desaturase ACP estearoíla de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) foi identificada e clonada (SEQ ID NO: 104). O construto de recombinação homóloga foi construído utilizando 0,5 kb da sequência de codificação SAPD na extremidade 5' (sítio alvo 5'), seguido pelo promotor Beta-tubulina *Chlamydomonas reinhardtii* acionando um gene *suc2* invertase de sacarose de levedura otimizada por códon com o *Chlorella vulgaris* 3'UTR. O resto (~1kb) da sequência de codificação SAPD de *Prototheca moriformis* foi então inserido após *C.vulgaris* 3'UTR para compor o sítio alvo 3'. A sequência para esse cassete de recombinação homóloga é listada na SEQ ID NO: 105. Como

mostrado acima, a taxa de sucesso para integração do cassete de recombinação homóloga no genoma nuclear pode ser aumentada por linearizar o cassete antes de transformar as microalgas, deixando extremidades expostas. O cassete de recombinação homóloga que “mira” uma enzima SAPD endógena em *Prototheca moriformis* é linearizado e então transformado na célula hospedeira (*Prototheca moriformis*, UTEX 1435). Uma integração bem sucedida eliminará a região de codificação de enzima SAPD endógena a partir do genoma hospedeiro através de um evento de recombinação recíproca duplo, enquanto a expressão do gene *suc2* recentemente inserido será regulada pelo promotor Beta-tubulina *C. reinhardtii*. Os clones resultantes podem ser selecionados utilizando placas/meios contendo sacarose como a fonte de carbono única. Clones contendo uma integração bem sucedida do cassete de recombinação homóloga terão a capacidade de crescer em sacarose como a fonte de carbono única e alterações em saturação geral dos ácidos graxos no perfil de lipídeo servirão como um fator de confirmação secundário. Adicionalmente, ensaios de Southern blotting utilizando uma sonda específica para o gene *suc2* de invertase de sacarose de levedura e RT-PCR podem também confirmar a presença e expressão do gene de invertase em clones positivos. Como alternativa, o mesmo construto sem o promotor Beta-tubulina pode ser utilizado para cortar a região de codificação de enzima SAPD endógena. Nesse caso, o gene *suc6* de invertase de sacarose de levedura recentemente inserido será regulado pelo promotor SAPD endógeno/5'UTR.

#### **EXEMPLO 14: produção de combustível**

##### **A. Extração de óleo de microalgas utilizando uma prensa de extrator e um meio auxiliar de prensa**

[00438] Biomassa de microalgas contendo 38% de óleo por DCW foi seca utilizando um secador de tambor resultando em teor de umidade de 5-5,5%. A biomassa foi alimentada para uma prensa L250 francesa. 30,4 kg (67

lbs) de biomassa foram alimentados através da prensa e nenhum óleo foi recuperado. A mesma biomassa microbiana seca combinada com percentagem variável de switchgrass como um meio auxiliar de prensa foi alimentada através da prensa. A combinação de biomassa microbiana seca e 20% peso/peso de switchgrass forneceu a melhor percentagem geral de recuperação de óleo. As massas prensadas foram então submetidas à extração de hexano e o rendimento final para a condição de 20% de switchgrass foi de 61,6% do óleo total disponível (calculado em peso). Biomassa com mais de 50% de óleo em peso de célula seca não exigiu o uso de um meio auxiliar de pressão como switchgrass para liberar óleo.

**B. Composição de monossacarídeo de biomassa deslipidada de *Prototheca moriformis***

[00439] *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) foi cultivada em condições e meios de nutrientes (com 4% de glicose) como descrito no exemplo 45 acima. A biomassa de microalgas foi então colhida e seca utilizando um secador de tambor. A biomassa de algas secas foi lisada e o óleo extraído utilizando uma prensa de extrator como descrito no exemplo 44 acima. O óleo residual na biomassa prensada foi então extraído com solvente utilizando éter de petróleo. Éter de petróleo residual foi evaporado do farelo deslipidado utilizando um Rotavapor (Buchi Labortechnik AG, Suíça). A análise de composição de Glicosila (monossacarídeo) foi então realizada no farelo deslipidado utilizando cromatografia de gás/espectrometria de massa, (GC/MS) combinada dos derivados per-O-trimetil silila (TMS) do monossacarídeo metil glicosídeo produzidos da amostra por metanólise acídica. Uma amostra de farelo deslipidado foi submetida à metanólise em 1M HCl em metanol a 80°C por aproximadamente 20 horas, seguido por re-N-acetilação com piridina e anidrido acético em metanol (para detecção de amino açúcares). As amostras foram então per-O-trimetil sililadas por tratamento com Tri-Sil (Pierce) a 80°C por 30 minutos (vide os métodos em

Merkle e Poppe (1994) Methods Enzymol. 230: 1-15 e York e outros, (1985) Methods Enzymol. 118:3-40). A análise de GC/MS do TMS metal glicosídeo foi realizada em um HP 6890 GC com interface com um 5975b MSD, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida EC-1 All Tech (30m x 0,25 mm ID). Os monossacarídeos foram identificados por seus tempos de retenção em comparação com padrões, e o caráter de carboidrato desses são autenticados por seus espectros de massa. 20 microgramas por amostra de inositol foram adicionados à amostra antes de derivação como padrão interno. O perfil de monossacarídeo da biomassa de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) deslipidada é resumido na tabela 18 abaixo. A percentagem total de carboidrato da amostra foi calculada como sendo 28,7%.

Tabela 18. Análise de composição de monossacarídeo (glicosila) de biomassa deslipidada de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435)

	Massa (µg)	Mol % (de total de carboidrato)
Arabinose	0,6	1,2
Xilose	n.d.	n.d.
Ácido galacturônico (GalUA)	n.d.	n.d.
Manose	6,9	11,9
Galactose	14,5	25,2
Glicose	35,5	61,7
N Acetil Galactosamina (GalNAc)	n.d.	n.d.
N Acetil Glicosamina (GlcNAc)	n.d.	n.d.
Heptose	n.d.	n.d.
3 Desoxi-2-mano-2-ácido octulsônico (KDO)	n.d.	n.d.
soma	57	100

n.d. = nenhum detectado

[00440] O teor de carboidrato e composição de monossacarídeo do farelo deslipidado torna o mesmo apropriado para uso como uma ração de animal ou como parte de uma formulação de ração de animal. Desse modo, em um aspecto, a presente invenção provê farelo deslipidado tendo o teor de produto exposto na tabela acima.

### C. Produção de biodiesel a partir de óleo de *Prototheca*

[00441] Óleo sem goma de *Prototheca moriformis* UTEX 1435, produzido de acordo com os métodos descritos acima, foi submetido à transesterificação para produzir ésteres de metila de ácido graxo. Os

resultados são mostrados abaixo:

[00442] O perfil de lipídeo do óleo foi:

C10:0	0,02
C12:0	0,06
C14:0	1,81
C14,1	0,07
C16:0	24,53
C16:1	1,22
C18:0	2,34
C18:1	59,21
C18:2	8,91
C18:3	0,28
C20:0	0,23
C20:1	0,10
C20:1	0,08
C21:0	0,02
C22:0	0,06
C24:0	0,10

Tabela 19. Perfil de biodiesel de óleo de triglicerídeo de *Prototheca moriformis*.

Método	Teste	Resultado	Unidades
ASTM D6751 A1	Capacidade de filtração de embeber frio de combustíveis de mistura de biodiesel	Tempo de filtração	120 s
		Volume filtrado	300 ml
ASTM D93	Copo fechado Pensky-Martens Ponto de inflamação	Procedimento usado	A
		Ponto de inflamação corrigido	165,0 °C
ASTM D2709	Água e sedimento em combustíveis destilados médios (método de centrífuga)	Sedimento e água	0,000 Vol. %
EN 14538	Determinação de teor de Ca e Mg por ICP OES	Soma de ( Ca e Mg)	<1 mg/kg
EN 14538	Determinação de teor de Ca e Mg por ICP OES	Soma de ( Na e K)	<1 mg/kg
ASTM D445	Viscosidade dinâmica/cinemática	Viscosidade cinemática @ 104 °F/ 40 °C	4,873 mm²/s
ASTM D874	Cinza sulfatada de óleos lubrificantes e aditivos	Cinza sulfatada	< 0,005 Wt %
ASTM D5453	Determinação de total de enxofre, mg /kg	1,7	mg/kg

Método	Teste	Resultado	Unidades
	enxofre em hidrocarbonetos leves, combustível de motor de ignição por centelha, combustível de motor diesel, e óleo de motor por fluorescência ultravioleta		
ASTM D130	Corrosão – tira de cobre	Biodiesel-Cu Corrosão 50°C (122°F)/3 h	1a
ASTM D2500	Ponto de névoa	Ponto de névoa	6 °C
ASTM D4530	Micro resíduo de carbono	Resíduo de carbono método micro médio	< 0,10 Wt %
ASTM D664	Número ácido de produtos de petróleo por titulação potenciométrica	Procedimento usado	A
		Número ácido	0,20 mg KOH/g
ASTM D6584	Determinação de glicerina total e livre em B-100 ésteres de metila de biodiesel por cromatografia de gás	Glicerina livre	< 0,005 Wt %
		Total de glicerina	0,123 Wt %
ASTM D4951	Elementos aditivos em óleos lubrificantes por ICP-AES	Fósforo	0,000200 Wt %

Método	Teste	Resultado	Unidades
ASTM D1160	Destilação de produtos de petróleo em pressão reduzida	IBP	248 °C
		AET @ 5% Recuperação	336 °C
		AET @ 10% Recuperação	338 °C
		AET @ 20% Recuperação	339 °C
		AET @ 30% Recuperação	340 °C
		AET @ 40% Recuperação	342 °C
		AET @ 50% Recuperação	344 °C
		AET @ 60% Recuperação	345 °C
		AET @ 70% Recuperação	347 °C
		AET @ 80% Recuperação	349 °C
		AET @ 90% Recuperação	351 °C
		AET @ 95% Recuperação	353 °C
		FBP	362 °C
		% Recuperada	98,5 %
		% de perda	1,5 %
		% de resíduo	0,0 %
		Volume de retenção fria	0,0 ml
		IBP	248 °C
EN 14112	Determinação de estabilidade de oxidação (teste de oxidação acelerada)	Estabilidade de oxidação	> 12 h
		Temp. de operação (normalmente 110 graus C)	110 °C
ASTM D4052	Densidade de líquidos por medidor de densidade digital	Gravidade API @ 60°F	29,5 °API
ASTM D 6890	Determinação de retardo de ignição (ID) e número de cetano derivado (DCN)	Número de cetano derivado (DCN)	> 61,0

[00443] O perfil de lipídeo do biodiesel foi altamente similar ao perfil de lipídeo do óleo de insumo. Outros óleos fornecidos pelos métodos e composições da invenção podem ser submetidos à transesterificação para fornecer biodiesel com perfis de lipídeo incluindo (a) pelo menos 4% C8-C14; (b) pelo menos 0,3% C8; (c) pelo menos 2% C10; (d) pelo menos 2% C12; e (3) pelo menos 30% C8-C14.

[00444] O método de capacidade de filtração de embeber frio pelo ASTM D6751 A1 do biodiesel produzido foi de 120 segundos para um volume de 300 ml. Esse teste envolve filtração de 300 ml de B100, resfriado a 40°F por 16 horas, deixado aquecer em temp. ambiente, e filtrado sob vácuo utilizando filtro de fibra de vidro de 0,7 micron com suporte de aço inoxidável. Óleos da invenção podem ser transesterificados para gerar biodiesel com um tempo de embeber frio menor do que 120 segundos, menor do que 100 segundos e menor do que 90 segundos.

#### **D. Produção de diesel renovável**

[00445] Óleo sem goma de *Prototheca moriformis* UTEX 1435, produzido de acordo com os métodos descritos acima e tendo o mesmo perfil de lipídeo que o óleo utilizado para fazer biodiesel no exemplo X acima, foi submetido à transesterificação para produzir diesel renovável.

[00446] O óleo foi primeiramente hidrotratado para remover oxigênio e a espinha dorsal de glicerol, fornecendo n-parafinas. As n-parafinas foram então submetidas à craqueamento e isomerização. Um cromatograma do material é mostrado na figura 13. O material foi então submetido à filtração fria, que removeu aproximadamente 5% do material C18. Após a filtração fria o total de volume de material foi cortado para ponto de inflamação e avaliado para ponto de inflamação, distribuição de destilação ASTM D-86, ponto de névoa e viscosidade. O ponto de inflamação foi de 63°C; a viscosidade foi de 2,86 cSt (centiStokes); o ponto de névoa foi de 4°C. os valores de destilação ASTM D86 são mostrados na tabela 20:



Tabela 20. Leituras em °C:

Volume	Temperatura
IBP	173
5	217,4
10	242,1
15	255,8
20	265,6
30	277,3
40	283,5
50	286,6
60	289,4
70	290,9
80	294,3
90	300
95	307,7
FBP	331,5

[00447] O T10-T90 do material produzido foi de 57,9°C. os métodos de hidrotratamento, isomerização e outra modificação covalente de óleos revelados aqui, bem como métodos de destilação e fracionamento (como filtração fria) revelados aqui, podem ser empregados para gerar composições de diesel renovável com outras faixas T10-T90, como 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 e 65°C utilizando óleos de triglicerídeo produzidos de acordo com os métodos revelados aqui.

[00448] O T10 do material produzido foi de 242,1°C. os métodos de hidrotratamento, isomerização e outra modificação covalente de óleos revelados aqui, bem como métodos de destilação e fracionamento (como filtração fria) revelados aqui, podem ser empregados para gerar composições de diesel renovável com outros valores T10, como T10 entre 180 e 295, entre 190 e 270, entre 210 e 250, entre 225 e 245, e pelo menos 290.

[00449] O T90 do material produzido foi de 300°C. Os métodos de hidrotratamento, isomerização e outra modificação covalente de óleos revelados aqui, bem como métodos de destilação e fracionamento (como filtração fria) revelados aqui, podem ser empregados para gerar composições de diesel renovável com outros valores T90, como T90 entre 280 e 380, entre 290 e 360, entre 300 e 350, entre 310 e 340 e pelo menos 290.

[00450] O FBP do material produzido foi de 300°C. Os métodos de hidrotratamento, isomerização e outra modificação covalente de óleos

revelados aqui, bem como métodos de destilação e fracionamento (como filtração fria) revelados aqui, podem ser empregados para gerar composições de diesel renovável com outros valores FBP, como FBP entre 290 e 400, entre 300 e 385, entre 310 e 370, entre 315 e 360, e pelo menos 300.

[00451] Outros óleos fornecidos pelos métodos e composições da invenção podem ser submetidos a combinações de hidrotratamento, isomerização e outra modificação incluindo óleos com perfis de lipídeo incluindo (a) pelo menos 4% C8-C14; (b) pelo menos 0,3% C8; (c) pelo menos 2% C10; (d) pelo menos 2% C12; e(3) pelo menos 30% C8-C14.

#### **EXEMPLO 15: Utilização de sacarose por *Chlorella luteoviridis***

##### **A. SAG 2214 Crescimento em glicose e sacarose**

[00452] SAG 2214 (designado como *Chlorella luteoviridis*) foi testado para crescimento no escuro em meio contendo glicose ou sacarose. Culturas de líquido heterotrófico foram iniciadas utilizando inóculo de um frasco congelado em meio contendo 4% de glicose ou 4% de sacarose como a fonte de carbono única. Culturas foram cultivadas no escuro, agitando a 200 rpm. As amostras das culturas foram tiradas a 0, 24, 48 e 72 horas de pontos de tempo e o crescimento foi medido por absorvência relativa em 750 nm (UV Mini1240, Shimadzu). SAG 2214 cresceu igualmente bem em glicose como em sacarose, mostrando que essa microalga pode utilizar sacarose tão eficazmente como glicose como uma fonte de carbono única. O resultado desse experimento é representado graficamente na figura 3.

##### **B. Produtividade de lipídeo e perfil de ácido graxo para SAG 2214**

[00453] A cepa de microalgas SAG 2214 foi cultivada em meio líquido contendo glicose ou sacarose como a fonte de carbono única em condições similares como descrito no exemplo 32 acima. Após 7 dias, células foram

colhidas para cálculo de peso de célula seca. As células foram centrifugadas e liofilizadas por 24 horas. As pelotas de célula seca foram pesadas e o peso de célula seca por litro foi calculado. As células para análise de lipídeo foram também colhidas e centrifugadas em 4000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram processadas para análise de lipídeo e perfil de ácido graxo utilizando procedimentos de cromatografia de gás padrão (GC/FID). Os resultados são resumidos abaixo nas tabelas 21 e 22.

Tabela 21. Produtividade de lipídeo e DCW para SAG 2214,

Amostra	Lipídeo (g/L)	DCW (g/L)	% Lipídeo DCW
SAG 2214 glicose	2,43	5,73	42,44%
SAG 2214 sacarose	0,91	2,00	45,56%

Tabela 22. Perfil de Ácido graxo para SAG 2214,

Ácido graxo	Porcentagem (peso/peso)
C:16:0	21
C:18:1	38
C:18:2	41

### **C. Comparação genômica de SAG 2214 com outras cepas *Chlorella luteoviridis***

[00454] A cepa de microalgas SAG 2214 provou ser de interesse geral devido a sua capacidade em crescer em sacarose como uma fonte de carbono (ilustrada acima). Além das características de crescimento dessa cepa, sua relação taxonômica com outras espécies de microalgas foi também de interesse. Designada pela coleção SAG como uma cepa *Chlorella luteoviridis*, o gene rRNA 23s de SAG 2214 foi seqüenciado em comparado com a sequência genômica 23s rRNA de nove outras cepas também identificadas pelas coleções UTEX e SAG como *Chlorella luteoviridis*. Essas cepas eram UTEX 21, 22, 28, 257 e 258, e cepas SAG 2133, 2196, 2198 e 2203. Os métodos de genotipagem de DNA utilizados foram iguais aos métodos descritos acima no exemplo 1, Alinhamentos de sequência e árvores não enraizadas foram geradas utilizando software de análise de DNA Geneious. De outras cepas que eram genótipos, UTEX 21, 22, 28 e 257 tinham sequência de DNA rRNA 23s idêntica (SEQ ID NO: 106). As outras cinco

cepas *Chlorella luteoviridis* tinham seqüências rRNA 23s que eram altamente homólogas a UTEX 21, 22, 28, e 257.

[00455] A sequência de gene rRNA 23s de SAG 2214 (SEQ ID NO: 30) é decididamente diferente daquela das outras nove cepas *C. luteoviridis*, tendo uma grande inserção que não foi encontrada nas outras cepas. A análise adicional dessa sequência de gene rRNA 23s utilizando BLAST indicou que compartilhou a maior homologia com membros do gênero *Leptosira* e *Trebouxia* (membros de porção ficobionte de líquens). Esses resultados indicaram que SAG 2214 pode não ser cepa *Chlorella luteoviridis* como categorizado pela coleção de cepas, porém em vez disso compartilha identidade de nucleotídeo rRNA 23s significativa com simbioses de algas encontrados em líquen. A análise genômica juntamente com as características de crescimento indicam que SAG 2214 podem ser uma fonte para genes e proteínas envolvidas no metabolismo de sacarose, bem como peptídeos de trânsito e sinalização responsáveis pela localização correta de tais enzimas. SAG 2214 e outras cepas com alto grau de similaridade genômica podem ser também cepas úteis para produção de óleo utilizando sacarose como fonte de carbono fixo.

[00456] Embora a presente invenção tenha sido descrita com relação a modalidades específicas da mesma, será entendido que é capaz de modificações adicionais. Esse pedido pretende cobrir quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção seguindo, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais afastamentos da presente revelação como compreendidos em prática conhecida ou costumeira na técnica à qual a invenção pertence e como pode ser aplicado às características essenciais expostas acima.

[00457] Todas as referências citadas aqui, incluindo patentes, pedidos de patente, e publicações são pela presente incorporadas a título de referência na íntegra, quer ou não anteriormente especificamente incorporadas. As publicações mencionadas aqui são citadas para fins de descrever e revelar

reagentes, metodologias e conceitos que podem ser utilizados com relação a presente invenção. Nada aqui deve ser interpretado como admissão de que essas referências são técnica anterior em relação às invenções descritas aqui. Em particular, os seguintes pedidos de patente são pela presente incorporadas a título de referência na íntegra para todas as finalidades: Pedido provisional US 60/941.581, depositado em 1 de junho de 2007, intitulado “Production of Hydrocarbons in Microorganisms”; Pedido provisional US 60/959.174, depositado em 10 de julho de 2007, intitulado “Production of Hydrocarbons in Microorganisms”; Pedido provisional US 60/968.291, depositado em 27 de agosto de 2007, intitulado “Production of Hydrocarbons in Microorganisms”; Pedido provisional US 61/024.069, depositado em 28 de janeiro de 2008, intitulado “Production of Hydrocarbons in Microorganisms”; Pedido PCT No. PCT/US08/65563, depositado em 2 de junho de 2008, intitulado “Production of Oil in Microorganisms”; Pedido de patente US 12/131.783, depositado em 2 de junho de 2008, intitulado “Use of Cellulosic Material for Cultivation of Microorganisms”; Pedido de patente US 12/131.773, depositado em 2 de junho de 2008, intitulado “Renewable Diesel and Jet Fuel from Microbial Sources”; Pedido de patente US 12/131.793, depositado em 2 de junho de 2008, intitulado “Sucrose Feedstock Utilization for Oil-Based Fuel Manufacturing”; Pedido de patente US 12/131.766, depositado em 2 de junho de 2008, intitulado “Glycerol Feedstock Utilization for Oil-Based Fuel Manufacturing”; Pedido de patente US 12/131.804, depositado em 2 de junho de 2008, intitulado “Lipid Pathway Modification in Oil-Bearing Microorganisms”; Pedido de patente US 61/118.590, depositado em 28 de novembro de 2008, intitulado “Production of Oil in Microorganisms”; Pedido de patente provisional US 61/118.994, depositado em 1 de dezembro de 2008, intitulado “Production of Oil in Microorganisms”; Pedido de patente provisional US 61/174.357, depositado em 3 de abril de 2009, intitulado “Production of Oil in Microorganisms”; Pedido de patente provisional US

61/219.525, depositado em 23 de junho de 2009, intitulado “Production of Oil in Microorganisms”; e Pedido PCT No. \_\_\_\_\_ [[Número do dossiê do procurador 026172-005010PC]], depositado em 30 de novembro de 2009, intitulado “Production of Tailored Oils in Heterotrophic Microorganisms”.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição de óleo de triglicerídeo, produzida pelocultivo de células de *Prototheca* recombinantes e extraídas a partir de ditas células por meio de extração por solvente ou usando uma prensa expelidora, em que as células compreendem um gene exógeno que codifica uma acil-ACP tioesterase graxa, , caracterizada em que a composição de óleo compreende um perfil de lipídios de:

- (a) pelo menos 4% de C8 a C14; e
- (b) um ou mais dos seguintes atributos:
  - i. 0,1 - 0,4 micrograma/ml de carotenoides; totais;
  - ii. menos do que 0,4 microgramas/ml de carotenoides totais;
  - iii. menos de 0,001 micrograma/ml de licopeno; e
  - iv. menos de 0,02 micrograma/ml de beta caroteno.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células são cultivadas na presença de uma fonte de carbono fixa selecionada do grupo que consiste de sacarose, glicose, frutose, suco de cana e material celulósico despolimerizado, em que dito material celulósico é opcionalmente polpa de beterraba.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células adicionalmente compreendem um gene exógeno que codifica uma sacarose invertase.

4. Composição de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que as células são cultivadas na presença de sacarose.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que as células são cultivadas na presença de sacarose obtida de sorgo, cana-de-açúcar ou beterraba.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que as células possuem um 23S rRNA compreendendo uma sequência com pelo menos 70% de

identidade de nucleotídeos com as sequências de nucleotídeos de um ou mais de SEQ ID NOs: 11-19.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que o gene exógeno ou genes exógenos são otimizados em códon para expressão em *Prototheca*.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que as células são selecionadas do grupo que consiste de *Prototheca moriformis*, *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora*, *Prototheca wickerhamii* e *Prototheca zopfii*.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que as células são *Prototheca moriformis*.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que o gene exógeno adicionalmente compreende uma sequência de direcionamento ao plastídio de microalga.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o gene exógeno que codifica o acil-ACP tioesterase graxa é otimizado em códon para expressão em *Prototheca*, em que a sequência codificante do gene exógeno contém o códon mais ou o segundo mais preferido da Tabela 1 para pelo menos 60% dos códons da sequência codificante.

12. Método para preparar um óleo misturado, caracterizado pelo fato de misturar a composição de óleo de triglicerídeos como definido em qualquer uma das reivindicação 1 a 11 com um óleo selecionado do grupo consistindo em óleo de soja, óleo de semente de colza, óleo de canola, óleo de palma, óleo de semente de palma, óleo de coco, óleo de milho, óleo vegetal residual, óleo de sebo chinês, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de semente de algodão, gordura de galinha, sebo bovino, sebo suíno, óleo de microalgas, óleo de macroalgas, óleo de *Cuphea*, óleo de linho, óleo de amendoim,



gordura branca de escolha, toucinho, óleo de *Camelina sativa*, óleo de semente de mostarda, óleo de noz de caju, óleo de aveia, óleo de tremoço, óleo de cânhamo brasileiro, óleo de calêndula, óleo de cânhamo, óleo de café, óleo de linhaça, óleo de noz, óleo de euforbia, óleo de semente de abóbora, óleo de coentro, óleo de camelina, óleo de gergelim, óleo de açafrão, óleo de arroz, óleo de tungue, óleo de cacau, óleo de copra, óleo de papoula, óleo de rícino, óleo de noz pecã, óleo de jojoba, óleo de jatrofa, óleo de macadâmia, óleo de castanha do pará, óleo de abacate, petróleo e uma fração destilada dos mesmos.

13. Método para fabricar um composto químico, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de realizar uma ou mais reações químicas selecionadas do grupo consistindo em (a) transesterificação, hidrogenação, hidrocraqueamento, desoxigenação, isomerização, esterificação, hidroxilação, hidrólise para gerar ácidos graxos livres, e saponificação na composição de óleo como definida na reivindicação 1 a 11, ou(b) hidroprocessamento, desoxigenação, e remoção de gás na composição de óleo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

14. Método para preparar um composto químico, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(i) misturar a composição de óleo de triglicerídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 com um óleo selecionado do grupo consistindo em óleo de soja, óleo de semente de colza, óleo de canola, óleo de palma, óleo de semente de palma, óleo de coco, óleo de milho, óleo vegetal residual, óleo de sebo chinês, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de semente de algodão, gordura de galinha, sebo bovino, sebo suíno, óleo de microalgas, óleo de macroalgas, óleo de *Cuphea*, óleo de linho, óleo de amendoim, gordura branca de escolha, toucinho, óleo de *Camelina sativa*, óleo de semente de mostarda, óleo de noz de caju, óleo de aveia, óleo de tremoço, óleo de cânhamo brasileiro, óleo de calêndula, óleo de cânhamo,

óleo de café, óleo de linhaça, óleo de noz, óleo de euforbia, óleo de semente de abóbora, óleo de coentro, óleo de camelina, óleo de gergelim, óleo de açafrão, óleo de arroz, óleo de tungue, óleo de cacau, óleo de copra, óleo de papoula, óleo de rícino, óleo de noz pecã, óleo de jojoba, óleo de jatrofa, óleo de macadâmia, óleo de castanha do pará, óleo de abacate, petróleo e uma fração destilada dos mesmos; e

(ii) realizar um ou mais reações químicas selecionadas do grupo que consiste de (a) transesterificação, hidrogenação, hidrocrackeamento, desoxigenação, isomerização, interesterificação, hidroxilação, hidrólise para gerar ácidos graxos livres, e saponificação na composição de óleo obtida em (i), ou (b) hidroprocessamento, desoxigenação e remoção de gás na composição de óleo obtida em (i).

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais reações químicas é selecionada de hidrogenação, hidrocrackeamento e desoxigenação.

16. Método de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais reações químicas é hidrólise para liberar ácidos graxos livres.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a reação de hidrólise da composição de óleo é selecionada do grupo que consiste em hidrólise ácida, hidrólise alcalina, hidrólise enzimática, hidrólise catalítica e hidrólise de água comprimida a quente, incluindo uma reação de hidrólise catalítica em que o óleo é dividido em glicerol e ácidos graxos.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que os ditos ácidos graxos são submetidos a uma reação química adicional selecionada do grupo consistindo em aminação ou ozonólise.

19. Método de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que uma ou mais reações é hidroprocessamento.

20. Método de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que uma ou mais reações químicas é desoxigenação.

Figura 1

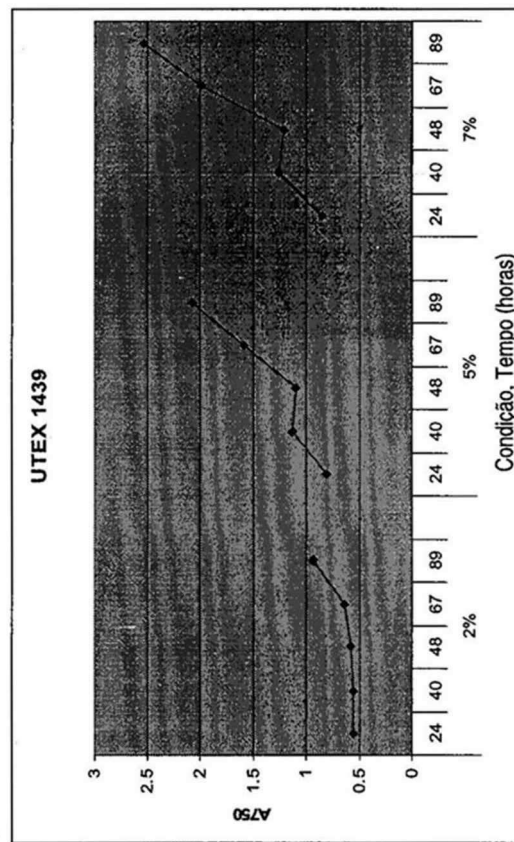
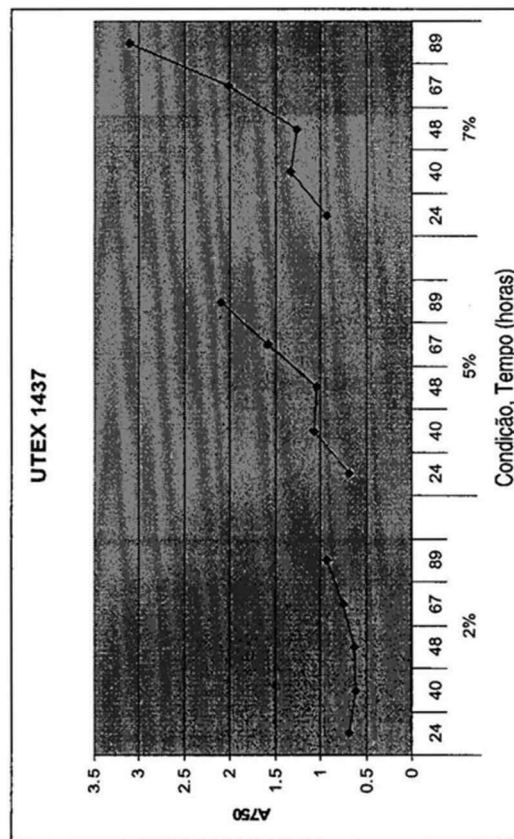
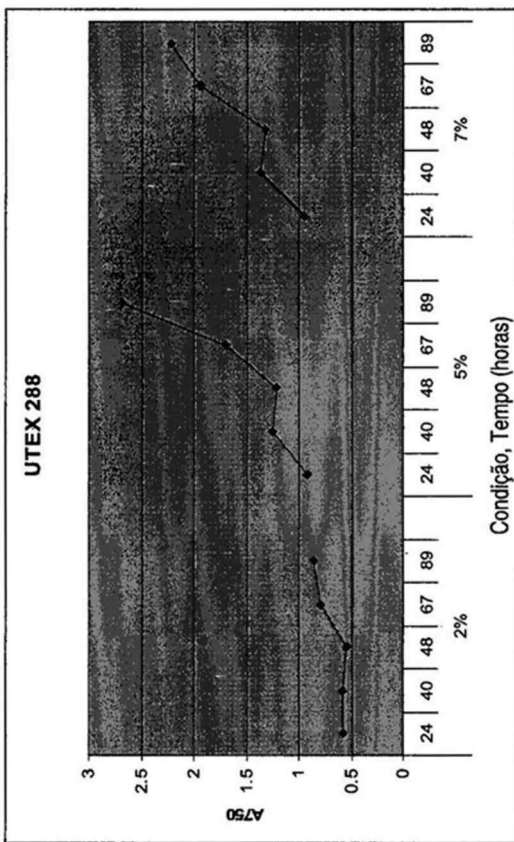
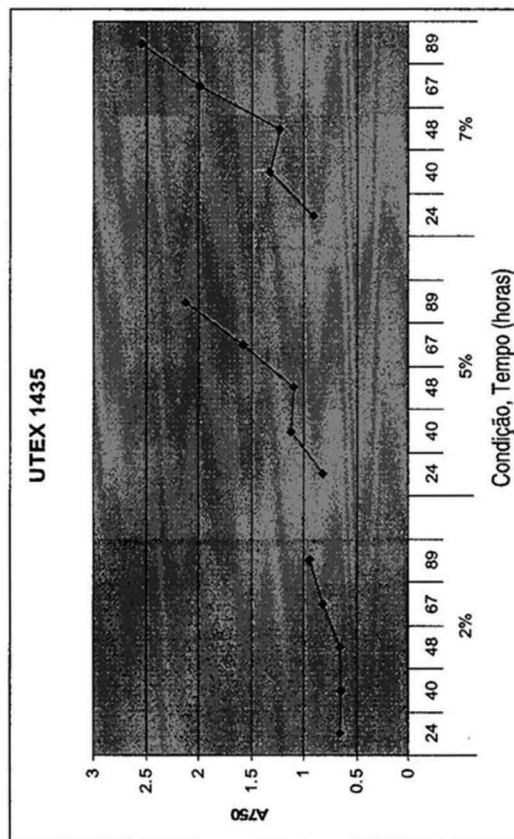


Figura 2

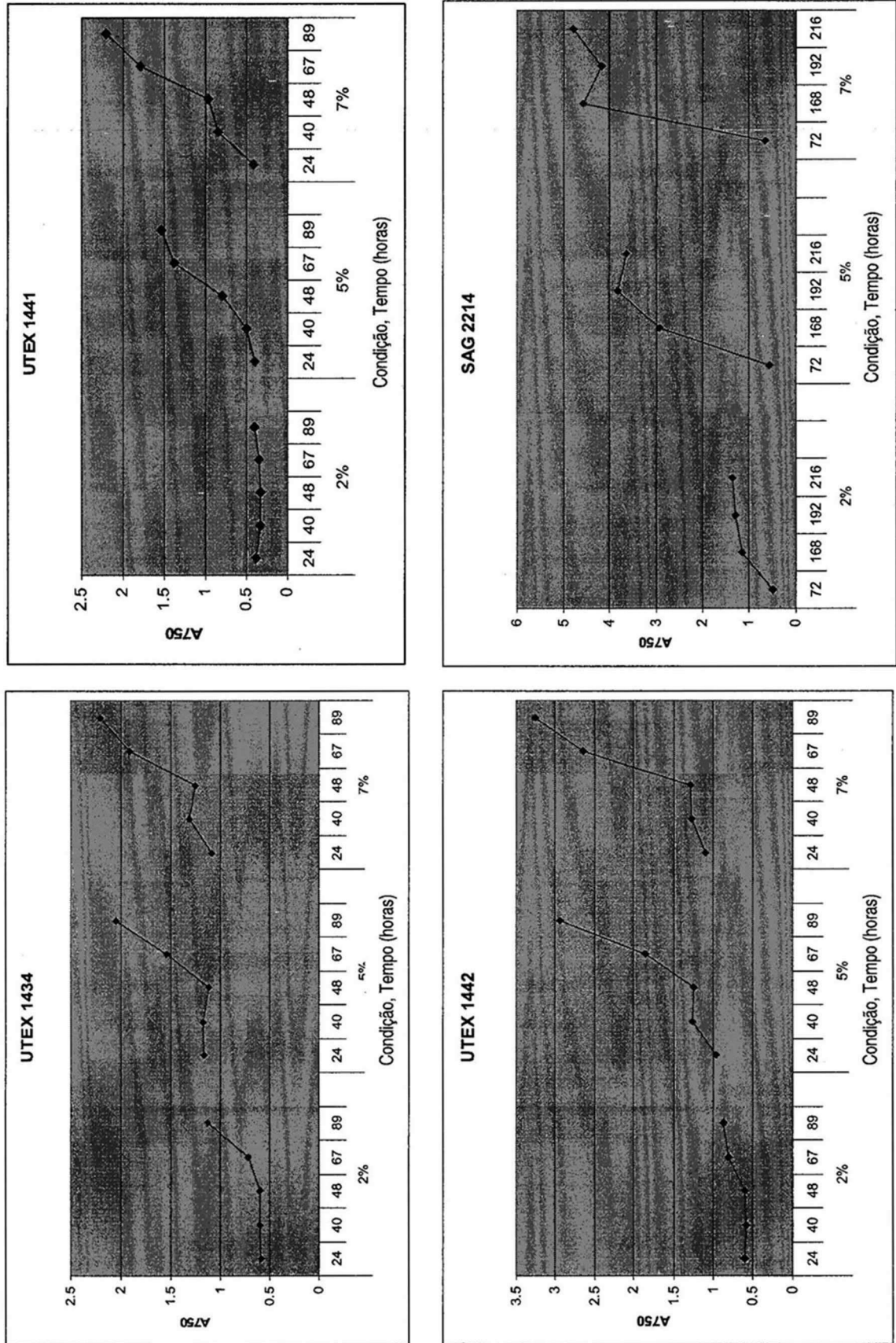


Figura 3

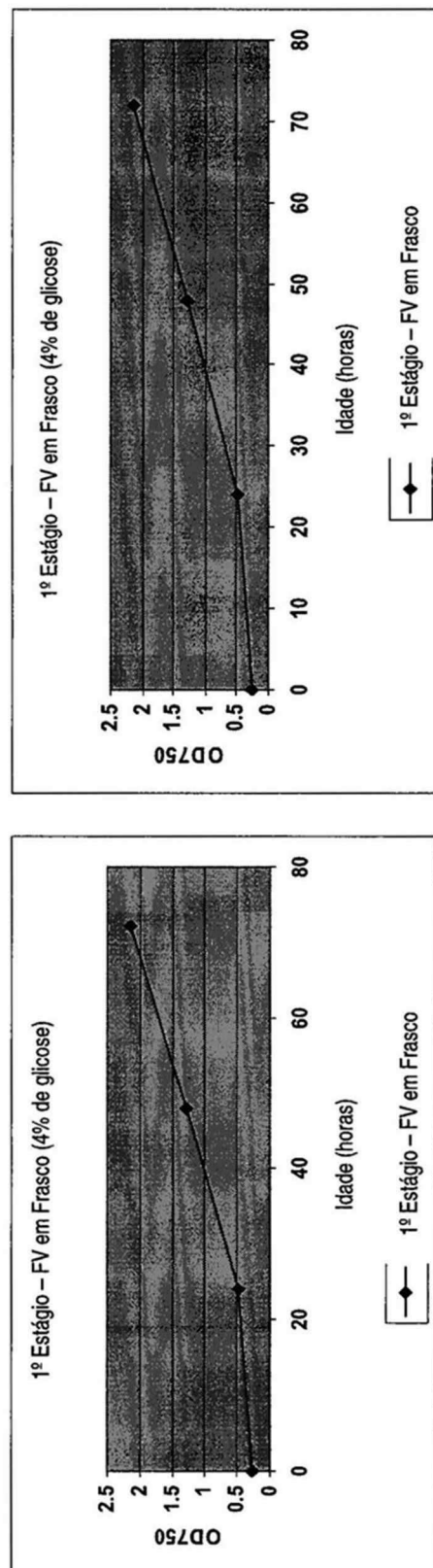


Figura 4

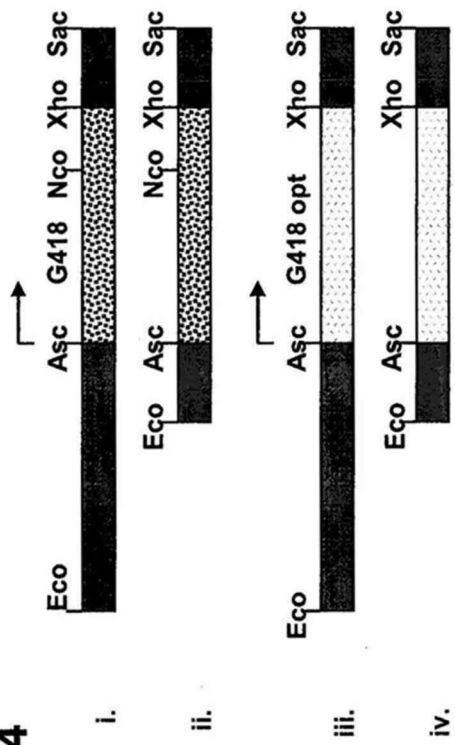
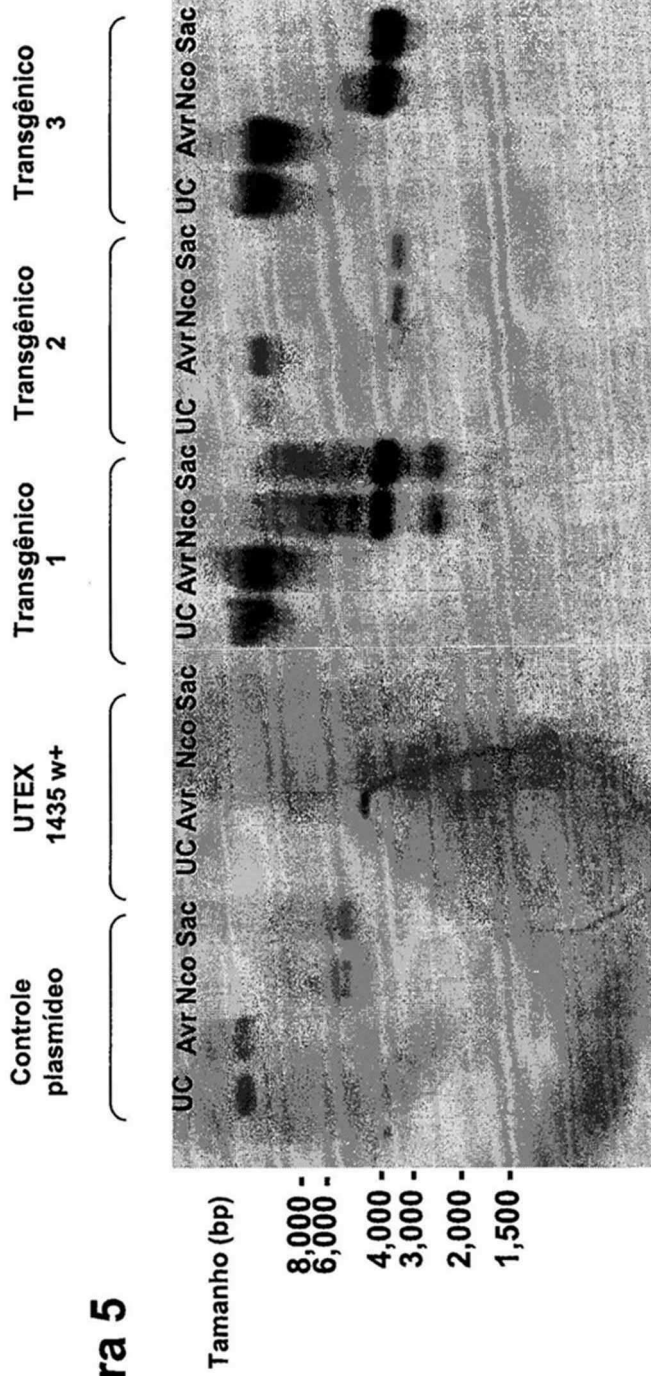


Figura 5



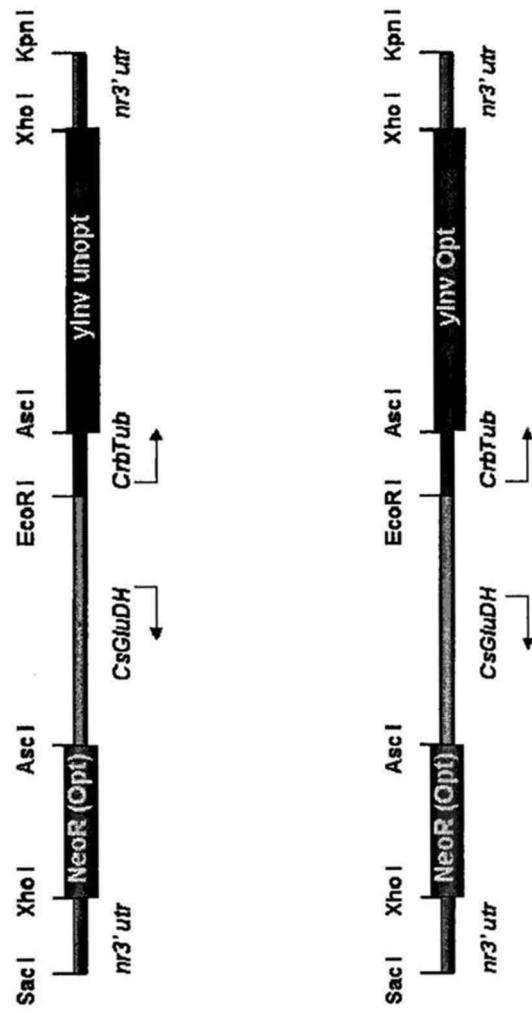


Figura 6



Figura 7a

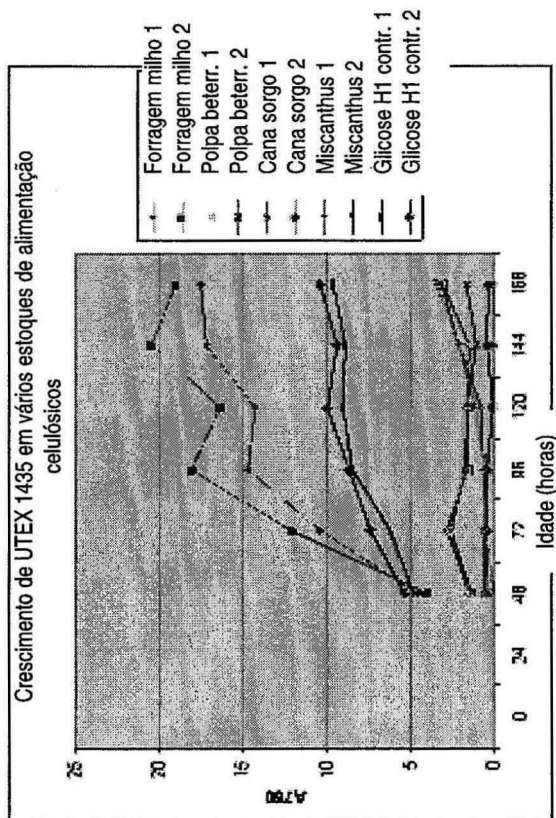


Figura 7b

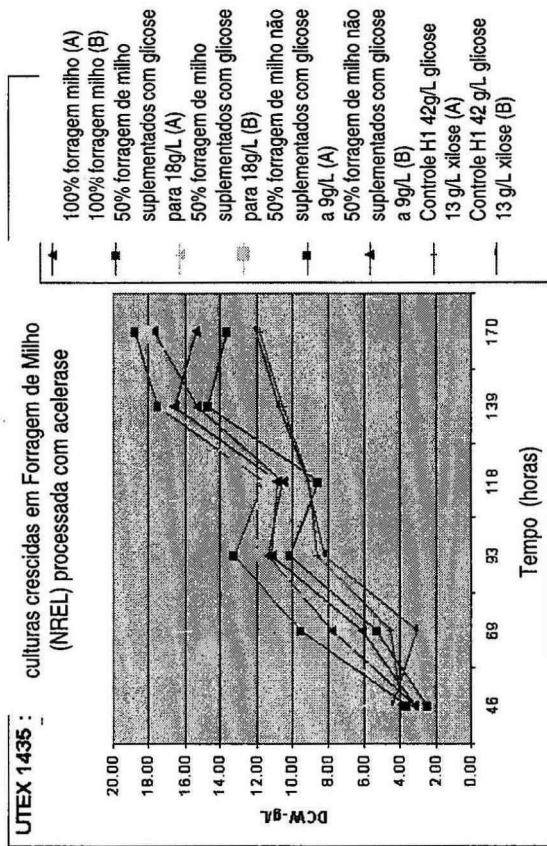


Figura 7c

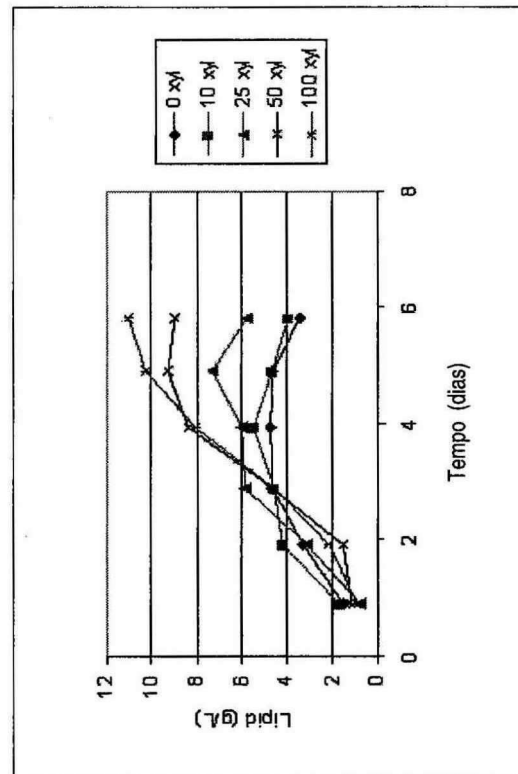
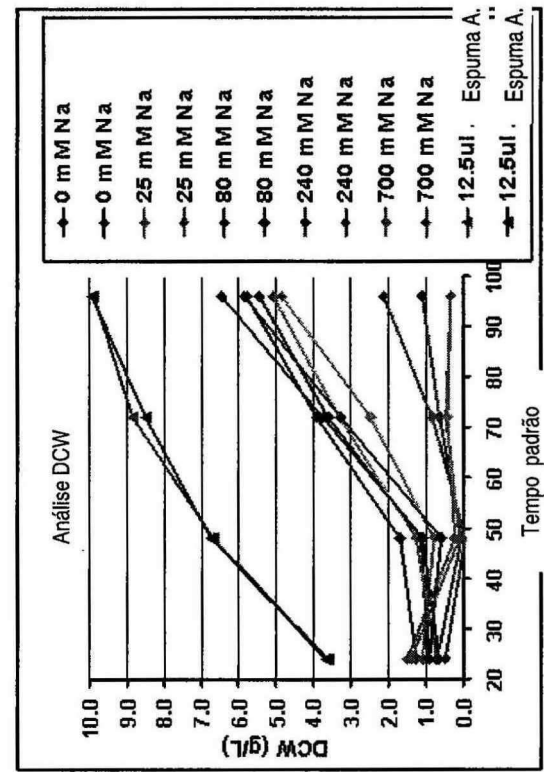


Figura 7d





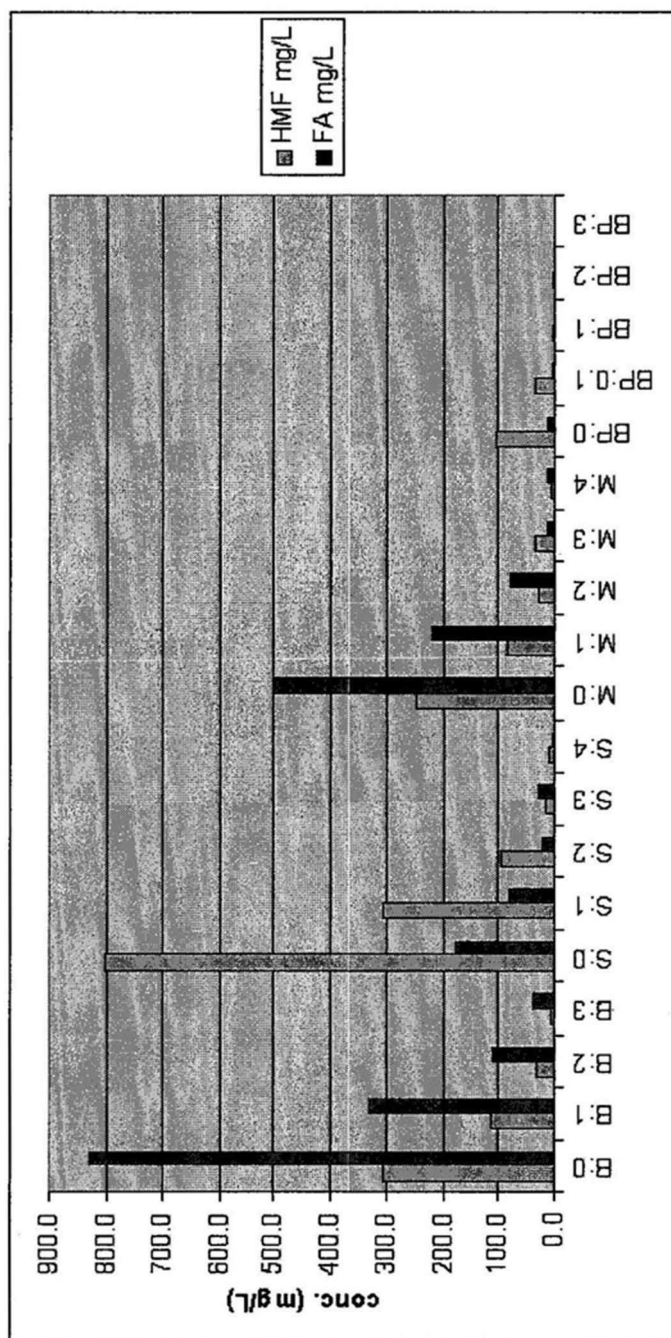


Figura 9

Figura 10

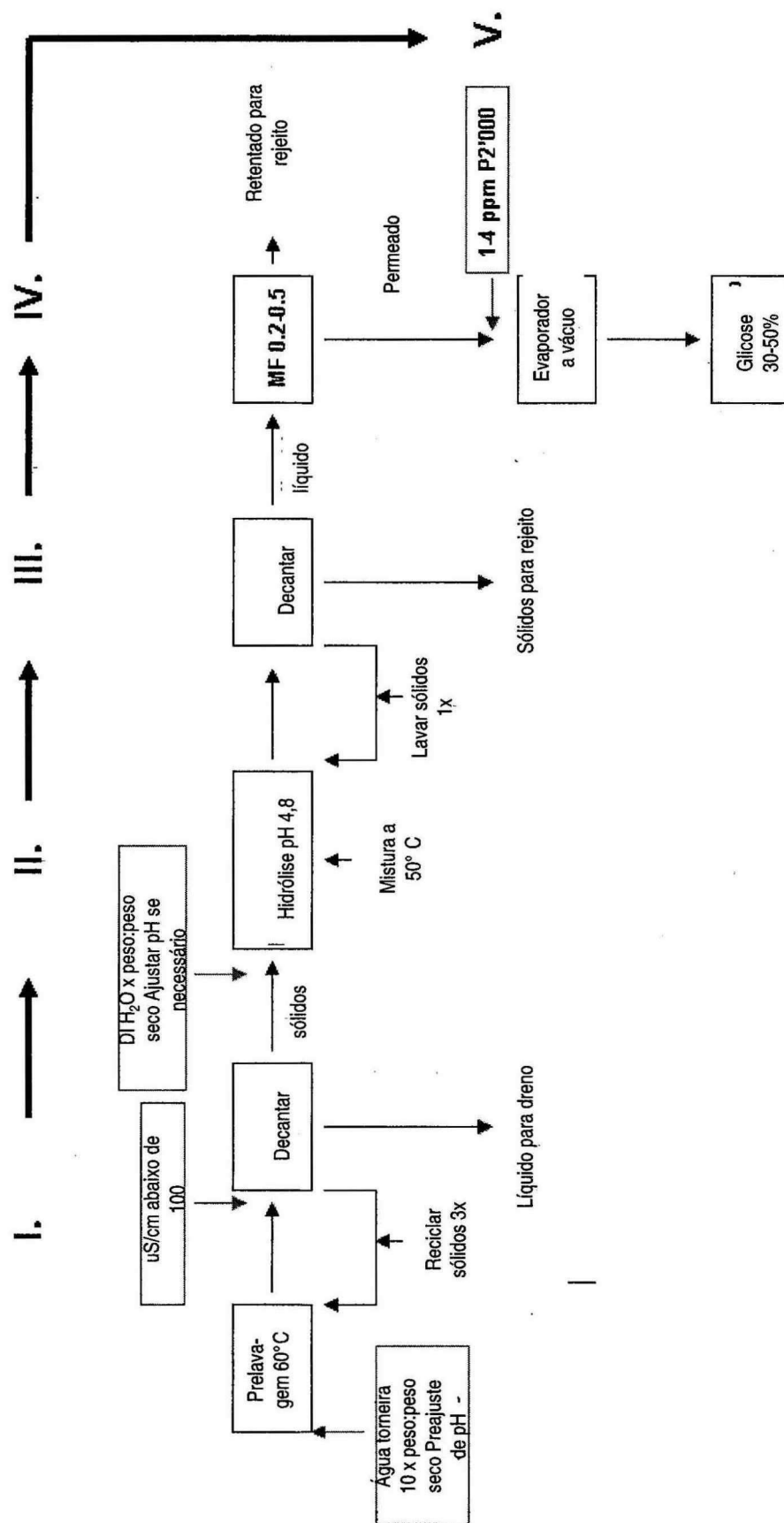


Figura 11

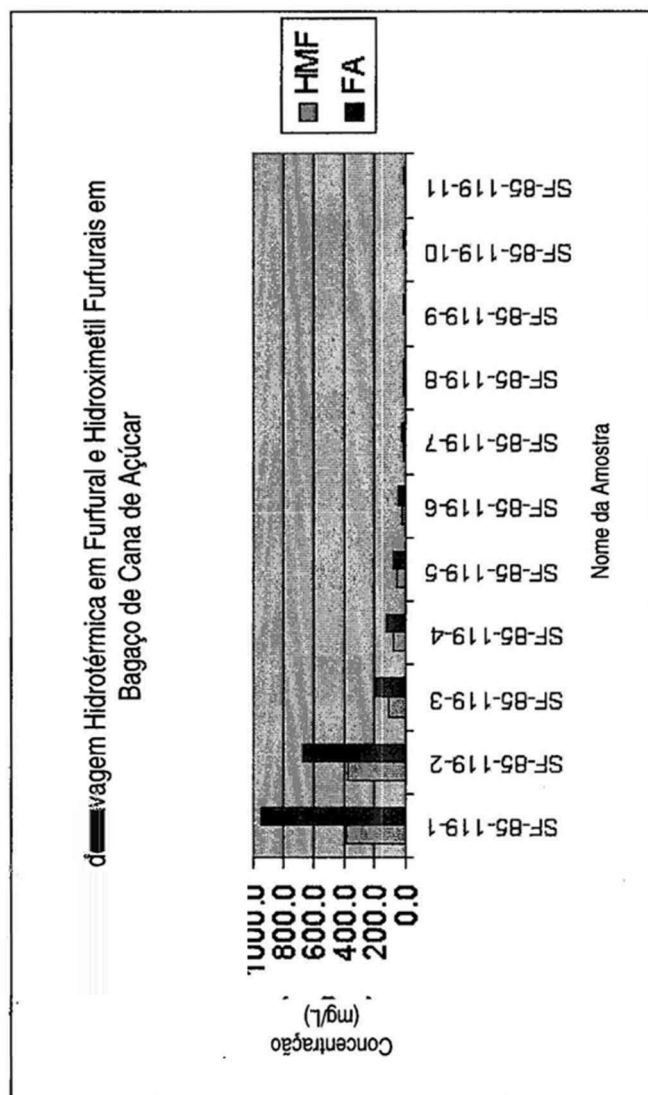


Figura 12

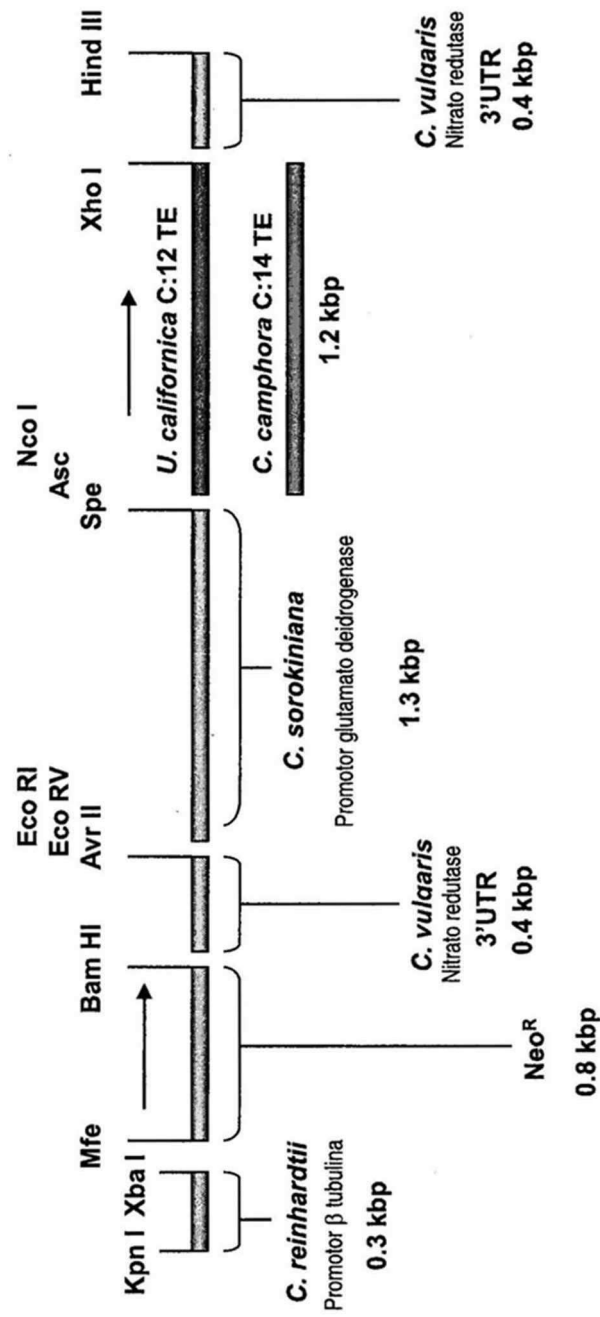


Figura 13

