



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

**(11) PI 0815860-6 B1**



**(22) Data do Depósito: 08/09/2008**

**(45) Data de Concessão: 20/04/2021**

---

**(54) Título:** MÉTODOS PARA PRODUZIR UM ÓLEO BIOLÓGICO

**(51) Int.Cl.:** C12P 7/64; C12P 1/04.

**(30) Prioridade Unionista:** 12/09/2007 US 60/960,037.

**(73) Titular(es):** DSM IP ASSETS B.V..

**(72) Inventor(es):** JAMES CASEY LIPPMEIER; DAVID CHRISTIAN MARTIN; JON MILTON HANSEN; JOSEPH W. PFEIFER; KIRK E. APT; WILLIAM ROBERT BARCLAY; PAUL WARREN BEHRENS.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2008010454 de 08/09/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/035551 de 19/03/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 12/03/2010

**(57) Resumo:** MÉTODOS PARA PRODUZIR UM ÓLEO BIOLÓGICO, MÉTODOS PARA PRODUZIR BIODIESEL, MÉTODOS PARA PRODUZIR BIOCOMBUSTÍVEL PARA AVIAÇÃO, COMPOSIÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL À BASE DE LIPÍDIOS, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM ÓLEO BIOLÓGICO. A presente invenção fornece óleos biológicos e métodos e uso destes. Os óleos biológicos são preferencialmente produzidos por fermentação heterotrófica de um ou mais microorganismos utilizando matéria-prima contendo celulose como principal fonte de carbono. A presente invenção também fornece métodos de produção de biocombustíveis à base de lipídios e alimentos, nutricionais e produtos farmacêuticos que utilizam os óleos biológicos.

## **MÉTODOS PARA PRODUZIR UM ÓLEO BIOLÓGICO**

### **REFERÊNCIA CRUZADA PARA OS PEDIDOS RELACIONADOS**

[001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade com base na seção 35 USC §119(e) para o pedido provisório US 60/960.037, depositado em 12 de setembro de 2007, cuja divulgação é incorporada ao presente pela referência em sua totalidade.

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[002] A presente invenção refere-se a óleos biológicos, bem como o uso e a produção destes. Os óleos biológicos da presente invenção podem ser produzidos pela fermentação de um microorganismo, de preferência usando uma matéria-prima contendo celulose. A presente invenção também se refere a métodos de produção de biocombustíveis à base de lipídios e aditivos para combustíveis e alimentos, nutricionais e produtos farmacêuticos que utilizam estes óleos biológicos.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[003] A produção de óleos de origem biológica, tais como de plantas (incluindo as sementes oleaginosas), microorganismos e animais são essenciais para diversas finalidades. Por exemplo, a produção do biodiesel requer grandes quantidades de óleos biológicos. O biodiesel tem sido proposto como um combustível líquido “carbono-neutro” alternativo ao diesel do petróleo. O biodiesel é mais comumente formado pela transesterificação de grupos acil de óleo lipídicos vegetais utilizando um álcool simples (tal como metanol, etanol ou isopropanol). Os ésteres de alquila resultantes podem ser queimados diretamente na maioria dos motores modernos de ignição por compressão sem quaisquer modificações mecânica. A densidade energética do biodiesel foi estimada em 95% da densidade energética do diesel de petróleo (ou “diesel fóssil”). Entretanto, a maior lubricidade do biodiesel (e, portanto, melhor eficiência do combustível) resulta em na obtenção de uma quilometragem

aproximadamente igual a partir de volumes equivalentes de diesel fóssil ou de biodiesel.

[004] Uma vez que o biodiesel é atualmente produzido principalmente a partir de óleos de sementes de plantas fixadoras de CO<sub>2</sub>, o combustível é considerado “carbono-neutro”, de modo que todo o CO<sub>2</sub> emitido a partir da queima do biodiesel estava recentemente na atmosfera, ao contrário do diesel fóssil, que quando queimado libera carbono que já não estava na atmosfera há milhões de anos. Portanto, o biodiesel e outros combustíveis considerados “carbono-neutro” podem ter muito a contribuir com os esforços globais na tentativa de reduzir a emissão de gases causadores do efeito de estufa (tal como o CO<sub>2</sub>).

[005] Vários estados dos Estados Unidos determinaram que o biodiesel seja misturado com o diesel fóssil vendido nestes estados, e o governo federal também fixou metas para o uso de combustível renovável nos transportes. O atual fornecimento de óleos vegetais para a transformação em biodiesel tem apresentado dificuldades na tentativa de atingir estes níveis de mandato, resultando em preços mais elevados para muitas culturas oleaginosas, especialmente a soja. Se as tendências atuais continuarem, os preços de importantes culturas oleaginosas podem subir significativamente. A meta final é substituir todas as fontes de combustíveis fósseis por biocombustíveis alternativos a preços competitivos. Infelizmente, se as atuais fontes de óleo para o biodiesel não mudarem significativamente, essa meta não poderá ser atingida.

[006] Reconhecendo este desafio, as investigações foram conduzidas em fontes alternativas de óleo para produção de biodiesel, incluindo a viabilidade de se produzir biodiesel a partir de algas fotossintéticas cultivadas em tanques abertos. Desde que algumas algas são oleaginosas e crescem muito rapidamente (para algumas, a duração de tempo a partir do inóculo até a

colheita é de menos de duas semanas), o rendimento teórico de óleo por hectare por ano poderia ser de magnitude maior do que o derivado de plantas superiores. Deve-se notar que as proporções pequenas das sementes na maioria das plantas superiores produtoras de óleo representa apenas uma pequena fração da massa total da planta, enquanto que as microalgas fotossintéticas podem acumular uma maior porcentagem em sua massa de óleo útil para a produção de biodiesel. Existem, entretanto, sérios problemas com a tecnologia das algas fotossintéticas que impedem a amplificação massiva, que é necessária para competir de maneira eficaz com a tecnologia do diesel fóssil.

[007] As microalgas fotossintéticas muitas vezes necessitam ser complementadas com CO<sub>2</sub> para atingir a alta produtividade de óleo. Da perspectiva da biorremediação, este é realmente um benefício de modo que o excesso de CO<sub>2</sub> liberado a partir do carvão ou óleo vegetal queimados em usinas elétricas, que de outra forma seriam liberados para a atmosfera, poderiam ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel. Esta abordagem, obviamente, não produz um combustível verdadeiramente “carbono neutro”, pois o CO<sub>2</sub> do carvão de usinas ainda é liberado eventualmente na atmosfera, (após a queima do biodiesel), porém isto retarda a taxa com que o CO<sub>2</sub> derivado de combustíveis fósseis é liberado e gera mais energia útil por unidade de massa de combustível fóssil. De fato, várias empresas foram criadas para aproveitar esta tecnologia, incluindo a *Greenfuels Inc*. A *Greenfuels Inc* utiliza especificamente sistemas fechados de fotobioreator nos quais são dissolvidos níveis muito elevados de CO<sub>2</sub> derivados de usinas elétricas alimentadas com combustíveis fósseis em culturas de algas fotossintéticas. Devido às limitações biofísicas do auto-sombreamento, o acúmulo de biomassa é dependente da área total de superfície iluminada. Dessa forma, fotobioreatores são necessários para produzir mesmo

quantidades limitadas de biodiesel. Portanto, apesar desta tecnologia ser útil como uma estratégia de biorremediação para sequestrar o carbono (e outros gases causadores do efeito estufa) derivado de combustíveis fósseis queimados em centrais elétricas, ela é pouco escalonável para os níveis necessários para atender à demanda de biodiesel no futuro.

[008] Para tratar das questões de escalabilidade, outras organizações optaram por desenvolver outras tecnologias de tanques abertos (*open pond*) para a produção fototrófica de biodiesel derivado de algas. Sistemas do tipo tanques abertos também dependem de suplementação com CO<sub>2</sub> para níveis hipoteticamente econômicos de acúmulo de óleo. Portanto, estes sistemas podem também ser melhor considerados como sistemas de biorremediação de resíduos de carbono a partir de combustíveis fósseis. O rendimento por acre por ano de óleo útil a partir destes sistemas está na ordem de magnitude maior do que pode ser derivada de sementes oleaginosas. De mais perspectivas, esses sistemas parecem ser a melhor resposta a uma oferta limitada de óleo biodiesel. No entanto, há um grave problema que ainda não foi abordado. Enquanto os rendimentos teoricamente absolutos de óleo por acre por ano são bastante elevados, a densidade real de biomassa acumulada em sistemas do tipo tanque aberto é relativamente diluída. Devido a isso, grandes volumes de meios de cultura precisam ser processados para extrair o óleo a partir da biomassa, o que poderia aumentar significativamente os custos do óleo final.

[009] E um caminho para a substituição da gasolina por alternativas renováveis como o etanol é menos complexo. Mas deve-se notar, no entanto, que o mercado para motores à combustão por compressão (que queimam diesel fóssil ou biodiesel) e para motores à combustão por ignição (que queimam gasolina ou etanol) geralmente apresentam diferentes necessidades. Motores por compressão oferecem torque superior, o que os torna mais úteis em aplicações industriais comparado aos motores à combustão por ignição que

oferecem uma maior aceleração (e dessa forma os tornam mais populares para o transporte em geral). Assim, não há razão para esperar que o motor à combustão por ignição pudesse substituir totalmente o motor à combustão por compressão mesmo que um substituto renovável para a gasolina já fosse completamente adotado.

[0010] Apesar de algumas desvantagens, muito se tem feito com o potencial do etanol para substituir a gasolina como combustível líquido para transportes. O modelo brasileiro, que depende da cana-de-açúcar como matéria-prima para a fermentação do etanol, tem sido frequentemente citado como um exemplo pioneiro de viabilidade do biocombustível. Mas infelizmente, os Estados Unidos não possui um clima que poderia suportar o tipo de produtividade da cana necessária para a massiva produção de etanol. Esforços iniciais na tentativa de ampliar a fermentação de etanol americano têm usado o xarope de milho e amido de milho como matéria-prima, mas há controvérsias em torno da sustentabilidade e escalabilidade desta solução também. Devido a isto, os esforços mais recentes têm se focado nas fontes “celulósicas” de açúcares para serem utilizadas como matérias-primas na fermentação do etanol. A matéria-prima celulósica pode ser qualquer matéria-prima contendo celulose.

[0011] Devido à maioria das plantas serem compostas principalmente de polissacarídeos estruturais (celulose e hemicelulose) e lignana, a área pode ser utilizada de forma mais eficiente se os monômeros de açúcar da celulose e outros polissacarídeos estruturais fossem mobilizados como matéria-prima para a fermentação de etanol. Isto está em contraste ao uso do amido de milho, que é encontrado apenas nos grãos da planta de milho e constituem uma percentagem relativamente baixa de peso seco da colheita. Além disso, visto que todas as plantas contêm celulose, as que crescem mais rápido e que são mais tolerantes ao clima, podem ser usadas como fonte primária de açúcar

baseado em celulose. Exemplos de tais plantas incluem *Switchgrass* (um tipo de painço), *Miscanthus giganteus* e Álamo.

[0012] Atualmente culturas para biodiesel primárias utilizam a terra de um modo igualmente ineficiente (como o milho para o etanol) já que apenas o óleo das sementes das culturas para biodiesel é destinada para a produção do biodiesel. Os processos de etanol celulósico ainda precisam ser adotados em larga escala, mas, até agora, o etanol celulósico é amplamente aceito como uma possível alternativa sustentável e economicamente competitiva à gasolina. Fontes de celulose já estão sendo consideradas para a produção de outros produtos derivados do petróleo (como o plástico).

[0013] As publicações dos pedidos de patentes WO 2005/035693, US 2005/0112735, WO 2007/027633, WO 2006/127512, US 2007/0099278, US 2007/0089356 e WO 2008/067605, cujos conteúdos são integralmente incorporados ao presente pela referência, dizem respeito aos sistemas de produção de biodiesel ou biocombustível.

[0014] Recentemente, a cultura heterotrófica da microalga *Chlorella protothecoides* por fermentação foi investigada para fins de produção do biodiesel. Pesquisadores da Universidade de Tsinghua, em Pequim, China, têm realizado estudos sobre a produção de biodiesel usando óleo da microalga heterotrófica *Chlorella protothecoides*. Nestes estudos, as microalgas são cultivadas em fermentadores utilizando a glicose ou hidrolisado de milho em pó, como fontes de carbono. O óleo de microalgas é então extraído e transesterificado para produzir biodiesel. Vide, Miao, X. e Wu, Q., *Bioresource Technology* 97: 841-846 (2006); Xu, H. *et al*, *Journal of Biotechnology* 126: 499-507 (2006). Embora esses pesquisadores tenham sugerido que o amido e as soluções de celulose hidrolisada possam ser um substituto de baixo custo para a glicose como fonte de carbono no processo de fermentação, eles também sugeriram que a hidrólise da celulose é difícil e dispendiosa. vide, Li,

X. et al. “Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoids* through heterotrophic cultivation in bioreactors” *Biotechnology and Bioengineering*, aceito para a publicação em Abril de 2007.

[0015] Além do diesel, outro combustível baseado em óleo que necessita de uma fonte renovável e sustentável é o combustível para aviação. As aeronaves dependem da utilização de vários tipos de combustível para aviação, incluindo os combustíveis para aviação do tipo querosene, e combustíveis para aviação do tipo nafta. A forte dependência da indústria da aviação na oferta limitada de combustíveis para aviões à base de petróleo cria uma necessidade urgente para a descoberta de biocombustíveis para a aviação renováveis.

[0016] Portanto, existe a necessidade de um método eficiente e de baixo custo para a produção de biocombustível à base de lipídios que possam ser facilmente escalonados para substituir o diesel fóssil e os combustíveis para aviação. Da forma utilizada no presente, a expressão “biocombustível à base de lipídios” refere-se a qualquer combustível que é produzido a partir de um óleo biológico da presente invenção, incluindo, mas não se limitando a, biodiesel, biocombustível para aviação, e combustíveis especiais. Para satisfazer esta necessidade, deve ser desenvolvido um método barato e simples para a produção de óleos biológicos que podem ser convertidos em biocombustível à base de lipídios. Para reduzir os custos de produção dos biocombustíveis à base de lipídios, existe a necessidade de um método de baixo custo para a produção de óleos biológicos através do uso de matérias-primas abundantes e baratas, tal como a matéria prima contendo celulose como principal fonte de carbono. Além da necessidade de utilizar matérias-primas baratas, existe a necessidade de melhorar os processos que também visa à redução de custos na produção de óleos biológicos. Os métodos aperfeiçoados de produção destes óleos biológicos não apenas reduz os

custos de produção de biocombustíveis à base de lipídeos, mas também irá reduzir os custos associados com o uso destes óleos biológicos em muitas outras aplicações, inclusive na alimentação, nutrição e produtos farmacêuticos.

[0017] Por exemplo, é desejável aumentar a ingestão de muitos nutrientes benéficos encontrados em óleos biológicos. Nutrientes benéficos incluem especialmente ácidos graxos, tal como ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFAs) ômega-3 e ômega-6 e seus ésteres. PUFAs Omega-3 são reconhecidos como importantes componentes da dieta para prevenir a arteriosclerose e doenças coronarianas, para aliviar as condições inflamatórias e para retardar a cultura das células tumorais. PUFAs Ômega-6 servem não só como lipídios estruturais no corpo humano, mas também como precursores de uma série de fatores na inflamação, tais como prostaglandinas, leucotrienos, e oxilipinas. Os PUFAS de cadeia longa ômega-3 e ômega-6 representam importantes classes de PUFAs.

[0018] Há duas principais séries ou famílias de LC-PUFAs, dependendo da posição da dupla ligação mais próxima à extremidade metil do ácido graxo. A série ômega-3 contém uma dupla ligação no terceiro carbono, enquanto a série ômega-6 não possui nenhuma ligação dupla até o sexto carbono. Assim, o ácido docosahexaenóico (“DHA”) tem um comprimento de cadeia de 22 carbonos com 6 duplas ligações começando no terceiro carbono a partir da extremidade metila e é designado “22:6 n-3”. Outros LC-PUFAs ômega-3 importantes incluem o ácido eicosapentaenóico (EPA), que é designado “20:5 n-3”, e ácido docosapentaenóico ômega-3 (“DPA n-3”), que é designado de “22: 5 n-3”. Outros LC-PUFAs ômega-6 importantes incluem o ácido araquidônico (“ARA”), que é designado “20:4 n-6”, e ácido docosapentaenóico ômega-6 (“DPA n-6”), que é designado “22:5 n-6”.

[0019] Devido ao fato dos seres humanos e muitos outros animais não serem capazes de sintetizar diretamente os ácidos graxos essenciais ômega-3

e ômega-6, eles devem ser obtidos pela dieta. Tradicionais fontes dietéticas de PUFAs incluem óleos vegetais, óleos de animais marinhos, óleos de peixe e sementes oleaginosas. Além disso, os óleos produzidos por determinados microorganismos foram encontrados por serem ricos em LC-PUFAs. A fim de reduzir os custos associados com a produção de fontes alimentares de PUFAs, existe a necessidade de um método eficiente e de baixo custo para produção de óleos biológicos contendo PUFAs. Para diminuir os custos de PUFA contendo óleos biológicos, existe a necessidade de desenvolver um método de produção destes óleos biológicos utilizando matérias-primas de baixo custo (tal como matérias primas contendo celulose) e processos aprimorados que são projetados para reduzir os custos de produção.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

[0020] A presente invenção fornece um método para produzir um óleo biológico que compreende a cultura de microorganismos do reino *Stramenopile* pela fermentação heterotrófica utilizando uma matéria-prima que compreende celulose como fonte de carbono, onde cerca de 11% a cerca de 99% dos ácidos graxos insaturados no óleo biológico são ácidos graxos poliinsaturados. Em algumas realizações da presente invenção, mais do que cerca de 50% dos ácidos graxos insaturados no óleo biológico são ácidos graxos poliinsaturados.

[0021] O microorganismo utilizado na presente invenção pode ser, mas não está limitado a, um *Thraustochytrid*, de preferência, selecionados do grupo constituído por microorganismos do gênero *Schizochytrium*, microorganismos do gênero *Thraustochytrium*, e os microorganismos do gênero *Ulkenia*.

[0022] Em algumas realizações da presente invenção, o microorganismo usado sacrifica a celulose. Preferencialmente, um microorganismo da presente invenção degrada ou é resistente aos componentes da matéria-prima selecionada a partir do grupo que consiste em lignina, hemicelulose, óleo vegetal, polissacarídeos extracelulares de plantas e suas combinações. Em

algumas realizações da presente invenção, o microorganismo é um microorganismo geneticamente modificado.

[0023] Um microorganismo da presente invenção pode produzir óleo na forma de triglicerídeos em uma quantidade de cerca de 25% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca. Em algumas realizações da presente invenção, a cultura da biomassa de microorganismos é realizada em uma concentração de oxigênio dissolvido de cerca de 10% a cerca de 100%. A produção de óleo biológico pelo microorganismo pode ser realizada em uma concentração de oxigênio dissolvido, por exemplo, 0% a cerca de 10%. Os microorganismos podem crescer a uma temperatura de cerca de 15°C a 45°C.

[0024] Em algumas realizações da presente invenção, o método de produção de óleo biológico compreende adicionalmente da execução de autólise ou lise induzida do microorganismo após o microorganismo ter produzido óleo em uma quantidade de cerca de 30% a cerca de 90% do peso de sua biomassa seca. A indução da lise do microorganismo pode ser obtida pela exposição do microorganismo a uma condição favorável para a lise selecionada a partir do grupo de condições que consistem em pH, temperatura, presença de uma enzima, presença de um detergente, rupturas físicas e combinações destas.

[0025] Em algumas realizações da presente invenção, a matéria-prima de fermentação contendo celulose compreende uma fonte de celulose selecionada a partir do grupo constituída por gramíneas, cana-de-açúcar, resíduos agrícolas, resíduos de papel, despejos, madeira, um organismo do reino *Viridiplantae*, e combinações destes.

[0026] Em realizações preferidas da presente invenção, a fermentação é realizada em um fermentador não estéril. Em algumas realizações da presente invenção, a fermentação é realizada em um fermentador selecionado a partir do grupo consistindo de: fermentadores de polímero reforçados com fibra,

fermentadores compostos de matriz de metal, fermentadores compostos de matriz de cerâmica, fermentadores compostos de termoplásticos, fermentadores de metal, fermentadores de aço carbono forrados com epóxi, fermentadores de aço carbono forrados com plástico, fermentadores de plástico, fermentadores de fibra de vidro e fermentadores de concreto.

[0027] Em realizações preferidas da presente invenção, a fermentação é realizada em um fermentador que está submerso em água. A fermentação pode ser realizada em fermentadores que possuem sistemas de refrigeração ligados em série de modo que o arrefecimento da água efluente do primeiro fermentador ou de um conjunto de fermentadores em série é utilizado como uma fonte de água para a refrigeração de um segundo fermentador ou conjunto de fermentadores em série. Da mesma forma, a fermentação pode ser realizada em fermentadores que possuem sistemas de gás ligados em série de modo que a difusão exaurida do primeiro fermentador ou de um conjunto de fermentadores em série é utilizada como uma fonte de gás para um segundo fermentador ou conjunto de fermentadores em série.

[0028] A presente invenção fornece adicionalmente um método para produzir biodiesel que compreende (a) a cultura de microorganismos do reino *Stramenopile* pela fermentação heterotrófica utilizando uma matéria-prima que compreende celulose como fonte de carbono para produzir um óleo biológico, em que cerca de 11% a cerca de 99% dos ácidos graxos insaturados no óleo biológico são ácidos graxos poliinsaturados, e (b) a transesterificação do óleo biológico para produzir o biodiesel. Em algumas realizações da presente invenção, mais do que cerca de 50% dos ácidos graxos insaturados no óleo biológico são ácidos graxos poliinsaturados.

[0029] A transesterificação do óleo biológico pode ser realizada utilizando um álcool derivado de um processo de produção de álcool. Em algumas realizações da presente invenção, o glicerol resultante da transesterificação do

óleo biológico pode ser utilizado como uma fonte de carbono para um processo de fermentação subsequente para produzir um álcool ou um óleo biológico. Em algumas realizações da presente invenção, no processo de fermentação subsequente cresce um microorganismo que é capaz de utilizar o glicerol como fonte de carbono.

[0030] A presente invenção fornece também um método para produzir biocombustível para aviação que compreende (a) a cultura de microorganismos do reino *Stramenopile* pela fermentação heterotrófica utilizando uma matéria-prima que compreende celulose como fonte de carbono para produzir um óleo biológico, em que cerca de 11 % a cerca de 99% dos ácidos graxos insaturados no óleo biológico são ácidos graxos poliinsaturados, e (b) o craqueamento do óleo biológico para produzir o biocombustível para aviação. Em algumas realizações da presente invenção, o óleo biológico usado para produzir biocombustível para aviação compreende cerca de 10% a cerca de 75% em peso de ácidos graxos poliinsaturados.

[0031] A presente invenção fornece uma composição de biocombustível à base de lipídios que compreende cerca de 1% a cerca de 75% em peso de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa com 20 ou mais carbonos.

[0032] Em algumas realizações da presente invenção, a composição de biocombustível à base de lipídios tem uma temperatura de fusão de cerca de 30°C a -50°C.

[0033] A presente invenção também fornece um método para produzir um óleo biológico que compreende: (a) a cultura de dois ou mais microorganismos de forma simultânea ou de maneira sequencial por fermentação heterotrófica, utilizando matéria-prima que compreende celulose como fonte de carbono, em que um ou mais dos microorganismos são capazes de sacarificar a dita celulose.

[0034] A presente invenção fornece ainda um método para produzir

biodiesel que compreende a transesterificação de um óleo biológico produzido por dois ou mais microorganismos que foram submetidos à fermentação heterotrófica utilizando matéria-prima que compreende de celulose como fonte de carbono, em que um ou mais dos microorganismos são capazes de sacarificar a celulose. Para produzir o biocombustível para aviação, o craqueamento pode ser executado em um óleo biológico produzido por dois ou mais microorganismos que foram submetidos à fermentação heterotrófica utilizando matéria-prima que compreende de celulose como fonte de carbono, em que um ou mais dos microorganismos são capazes de sacarificar a celulose.

[0035] A presente invenção fornece um método para produzir um óleo biológico que compreende a cultura de microorganismos heterotróficos por fermentação em um fermentador não estéril. Em algumas realizações da presente invenção, o óleo biológico é produzido em uma taxa de cerca de 5 g/L/dia até cerca de 70 g/L/dia, preferencialmente a uma taxa de cerca de 30 g/L/dia até cerca de 70 g/L/dia em um fermentador não estéril.

[0036] Em algumas realizações da presente invenção, a cultura de microorganismos no fermentador não estéril atinge uma densidade de células de cerca de 10 g/L a cerca de 300 g/L, e preferencialmente cerca de 150 g/L a cerca de 250 g/L. Preferencialmente, a cultura do microorganismo compreende o uso da celulose como fonte de carbono.

[0037] A presente invenção também fornece um método para produzir biodiesel que compreende: (a) a cultura de um microorganismo em um fermentador não estéril para produzir um óleo biológico, e (b) a transesterificação do óleo biológico para produzir biodiesel. A presente invenção também fornece um método para produzir biocombustível para aviação que compreende: (a) a cultura de um microorganismo em um fermentador não estéril para produzir um óleo biológico; e (b) o craqueamento

do óleo biológico para produzir o biocombustível para aviação.

[0038] A presente invenção fornece um método para produzir biodiesel que compreende: (a) a cultura de um microorganismo utilizando nutrientes compreendendo um meio reciclado para produzir um óleo biológico, e (b) a transesterificação do óleo biológico para produzir biodiesel. O meio reciclado pode ser, mas não está limitado a, biomassa deslipidada, biomassa hidrolisada, biomassa parcialmente hidrolisada, metais reciclados, sais reciclados, aminoácidos reciclados, carboidratos extracelulares reciclados, glicerol reciclado, biomassa de levedura reciclada e combinações destes. Preferencialmente, a cultura de microorganismos é constituída pelo uso da celulose como fonte de carbono.

[0039] A presente invenção também fornece um método para produzir biocombustível para aviação que compreende: (a) a cultura de um microorganismo utilizando nutrientes compreendendo um meio reciclado para produzir um óleo biológico, e (b) o craqueamento do óleo biológico para produzir biocombustível para aviação.

[0040] Algumas realizações da presente invenção fornecem um método para produzir biodiesel que compreende: (a) a cultura de um microorganismo utilizando um sistema de fermentação compreendendo uma etapa de semeadura contínua e uma etapa de produção lipídica para produzir um óleo biológico; e (b) a transesterificação do óleo biológico para produzir biodiesel. Preferencialmente, a etapa de semeadura contínua produz a biomassa do microorganismo de tal forma que cerca de 10% a cerca de 95% da produção total de biomassa do microorganismo é realizada durante a etapa de semeadura contínua. Em algumas realizações da presente invenção, a etapa de produção de lipídios é realizada por um processo de batelada alimentado (*fed-batch*). Preferencialmente, a etapa de produção de lipídeos produz lipídeos de tal forma que cerca de 10% a cerca de 95% da produção total de lipídeos do

microorganismo é atingida durante a etapa de produção de lipídeos. Em algumas realizações da presente invenção, a cultura do microorganismo compreende o uso de celulose como uma fonte de carbono.

[0041] A presente invenção também fornece um método de produção de biocombustível para aviação que compreende: (a) a cultura de um microorganismo utilizando um sistema de fermentação compreendendo uma etapa de semeadura contínua e uma etapa de produção lipídica para produzir um óleo biológico; e (b) o craqueamento do óleo biológico para produzir o biocombustível para aviação.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[0042] A Figura 1 exhibe várias realizações de um método de produção de óleos biológicos e biodiesel de acordo com a presente invenção.

[0043] A Figura 2 exhibe um exemplo de um projeto de sistema de fermentação de acordo com a presente invenção.

[0044] A Figura 3 exhibe os gráficos do peso celular seco, percentagem por peso de lipídios, percentagem por peso de DHA, e a quantidade de lipídios produzidos por litro de caldo de fermentação ao longo do tempo para a cultura de um microorganismo (ATCC 20888) sob condições estéreis e não estéreis descritas no Exemplo 4.

[0045] A Figura 4 exhibe os gráficos da taxa de consumo de açúcar, taxa de produção de óleo (em gramas por litro de caldo de fermentação por dia), taxa de produtividade de biomassa (em gramas por litro por dia), e a quantidade de biomassa livre de lipídeos ao longo do tempo para a cultura de um microorganismo (ATCC 20888) sob condições estéreis e não estéreis conforme descrito no Exemplo 4.

[0046] A Figura 5 exhibe um diagrama de um processo de fermentação de duas etapas que compreende uma etapa de semeadura contínua e uma etapa de acúmulo de lipídeos de batelada alimentado (*fed-batch*).

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[0047] A presente invenção fornece óleos biológicos, bem como o uso e a produção destes. Algumas realizações da presente invenção fornecem oleaginosas, organismos heterotróficos e processos adequados para a conversão de carbono, através da fermentação, de maneira direta baseada na celulose ou sacarídeos baseados na lignocelulose dentro do óleo vegetal para a fabricação de biodiesel. Os processos da presente invenção seria mais escalonável, sustentável e geraria um custo mais competitivo do que o biodiesel atualmente utilizado ou processos pesquisados (tal como o biodiesel do óleo de sementes ou biodiesel de algas fotossintetizantes).

[0048] Alguns aspectos da presente invenção envolvem a cultura em alta densidade de dois microorganismos oleaginosos utilizando matérias-primas celulósicas sacarificadas. Por exemplo, o protista *Schizochytrium sp.* e a levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* são adequados para estes processos, porque ambas têm sistemas de transformação bem desenvolvidos para a modificação dos microorganismos e são capazes de produzir níveis elevados de lipídios pela fermentação. Alguns aspectos da presente invenção fornecem oleaginosas *Thraustochytrides* e fungos capazes de crescer em uma diversidade de substratos lignocelulósicos e celulósicos, e organismos que podem ser naturalmente passíveis de sacarificação e fermentação combinada, bem como a degradação ou resistência à lignina.

[0049] A presente invenção é também direcionada ao aperfeiçoamento de cepas de organismos e processos para a utilização de substratos à base de celulose na produção de óleos através de métodos moleculares, biológicos, da genética clássica e fisiológicos. Algumas realizações da presente invenção fornecem um aumento em escala econômico de um processo de fermentação para a conversão de acilglicerídeos celulares em biodiesel. A presente invenção também fornece modelos e construções de reatores biológicos e

químicos, bem como estratégias de produção comercial para a realização dos métodos da invenção.

[0050] Vários organismos podem ser usados para a produção de óleo biológico de acordo com a presente invenção, incluindo microorganismos. Os microorganismos podem ser algas, bactérias, fungos e protistas. Fontes microbianas e métodos para o cultivo de microorganismos são bem conhecidos no estado da técnica (*Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2ª Edição, 1999, *American Society for Microbiology*). Por exemplo, os microorganismos podem ser cultivados em um meio de fermentação em um fermentador. Os óleos produzidos por microorganismos podem ser utilizados nos métodos e composições da presente invenção. Em algumas realizações, os organismos incluem aqueles selecionados do grupo que é constituído por algas douradas (tal como os microorganismos do reino *Stramenopiles*), algas verdes, diatomáceas, dinoflagelados (tais como os microorganismos da ordem *Dinophyceae*, incluindo membros do gênero *Cryptocodinium* como, por exemplo, *Cryptocodinium cohnii*), leveduras (tal como um membro dos gêneros *Yarrowia* (como a *Yarrowia lipolytica*), *Cryptococcus* (tal como o *Cryptococcus albidus*), *Trichosporon*, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium* e *Rhodotorula*), e fungos dos gêneros *Mucor* e *Mortierella*, incluindo, mas não se limitando a, *Mortierella alpina* e *Mortierella sect, schmuckeri*. Membros do grupo microbiano *Stramenopiles* incluem microalgas e microorganismos similares a algas, incluindo os seguintes grupos de microorganismos: *Hamatores*, *Proteromonads*, *Opalines*, *Develpayella*, *Diplophrys*, *Labrinthulids*, *Thraustochytrids*, *Biosecids*, *Oomicetos* *Hipochytridiomicetos*, *Commation*, *Reticulosphaera*, *Pelagomonas*, *Pelagococcus*, *Ollicola*, *Aureococcus*, *Parmales*, *diatomáceas*, *Xantófitos*, *Phaeofitos* (alga marrom), *Eustigmatófitos*, *Rafidófitos*, *Synurids*, *Axodines* (incluindo *Rhizochromulinaales*, *Pedinellales*, *Dictyochales*), *Chrysomeridales*, *Sarcinochrysidales*, *Hydrurales*, *Hibberdiales* e

*Chromulinales*. Os *Thraustochytrides* incluem os gêneros *Schizochytrium* (incluindo as espécies *aggregatum*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum*, *octosporum*), *Thraustochytrium* (incluindo as espécies *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum*, *striatum*), *Ulkenia* (incluindo as espécies *amoeboidea*, *kerquelensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrids*, *visurgensis*, *yorkensis*), *Aplanochytrium* (incluindo as espécies *haliotidis*, *kerquelensis*, *profunda*, *stocchinoi*), *Japonochytrium* (incluindo as espécies *marinum*), *Althornia* (incluindo a espécie *crouchii*), e *Elina* (incluindo a espécie *marisalba*, *sinorifica*). O *Labrinthulids* inclui os gêneros *Labyrinthula* (incluindo as espécies *algeriensis*, *coenocystis*, *chattonii*, *macrocystis*, *macrocystis atlantica*, *macrocystis macrocystis*, *marina*, *minuta*, *roscoffensis*, *valkanovii*, *vitellina*, *vitellina pacifica*, *vitellina vitellina*, *zopfi*), *Labyrinthomyxa* (incluindo a espécie *marina*), *Labyrinthuloides* (incluindo as espécies *haliotidis*, *yorkensis*), *Diplophrys* (incluindo a espécie *archeri*), *Pyrrhosorus*\* (incluindo a espécie *marinus*), *Sorodiplophrys*\* (incluindo a espécie *stercorea*), *Chlamydomyxa*\* (incluindo as espécies *labyrinthuloides*, *montana*). (\* = não há atualmente um consenso geral sobre o exato posicionamento taxonômico destes gêneros).

[0051] Algumas realizações da presente invenção fornecem um método para produzir um óleo biológico que compreende a cultura de um microorganismo do reino *Stramenopile* pela fermentação heterotrófica utilizando matéria-prima que compreende celulose como fonte de carbono. Em algumas realizações da presente invenção, o óleo biológico contém ácidos graxos insaturados, dos quais uma parcela significativa é formada por ácidos graxos poliinsaturados. Como descrito anteriormente, determinados ácidos graxos poliinsaturados, tais como ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ômega-3 e ômega-6 são componentes da dieta especialmente importantes. Portanto, é desejável produzir um óleo biológico com uma

quantidade significativa de ácidos graxos poliinsaturados. Em algumas realizações da presente invenção, os óleos biológicos são convertidos em biocombustíveis à base de lipídeos. Para tais aplicações, pode ser desejável produzir hidrocarbonetos de diferentes comprimentos de cadeia, em especial para aplicações de biocombustível para aviação. A presença de quantidades significativas de ácidos graxos poliinsaturados nos óleos biológicos utilizados para a produção de biocombustíveis à base de lipídios proporcionará uma maior flexibilidade e variedade para a produção de hidrocarbonetos, uma vez que múltiplos sítios de insaturação em um ácido graxo poliinsaturado fornecem múltiplos sítios de clivagem para produzir hidrocarbonetos. Por exemplo, certos combustíveis para aviação exigem hidrocarbonetos com dois a oito carbonos. Os ácidos graxos poliinsaturados podem ser clivados por meio de processos conhecidos no estado da técnica, tal como o craqueamento, para produzir hidrocarbonetos mais curtos de diferentes comprimentos de cadeia.

[0052] Em algumas realizações, os óleos biológicos produzidos pelos métodos da presente invenção possuem ácidos graxos insaturados em que cerca de 11% a cerca de 99% dos ácidos graxos insaturados nos óleos biológicos são ácidos graxos poliinsaturados. Os óleos biológicos da presente invenção podem conter ácidos graxos insaturados em que cerca de 20% a cerca de 99%, cerca de 26% a cerca de 99%, cerca de 30% a cerca de 99%, cerca de 40% a cerca de 99%, cerca de 51% a cerca de 99%, cerca de 60% a cerca de 99%, cerca de 70% a cerca de 99%, cerca de 80% a cerca de 99%, ou cerca de 90% a cerca de 99% dos ácidos graxos insaturados nos óleos biológicos são ácidos graxos poliinsaturados. Em algumas realizações da presente invenção, mais do que cerca de 10%, mais do que cerca de 20%, mais do que cerca de 25%, mais do que cerca de 30%, mais do que cerca de 40%, mais do que cerca de 50%, mais do que cerca de 60%, mais do que cerca de 70%, mais do que cerca de 80%, ou mais do que cerca de 90% dos

ácidos graxos insaturados nos óleos biológicos são ácidos graxos poliinsaturados.

[0053] Em algumas realizações da presente invenção, o óleo biológico compreende cerca de 10% a cerca de 75% em peso de ácidos graxos poliinsaturados. Para determinados usos, o óleo biológica compreende preferencialmente cerca de 20% a cerca de 75%, cerca de 30% a cerca de 75%, cerca de 40% a cerca de 75%, cerca de 50% a cerca de 75%, ou cerca de 60% a cerca de 75% em peso, de ácidos graxos poliinsaturados. Em algumas realizações da presente invenção, o óleo biológico compreende pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos, cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 70% em peso de ácidos graxos poliinsaturados. Os métodos de produção de um óleo biológico de acordo com a presente invenção podem opcionalmente, compreender ainda a coleta do óleo biológico a partir do microorganismo.

[0054] Como utilizado na presente invenção, o termo “celulose” inclui a celulose não sacarificada ou celulose não hidrolisada, bem como a celulose sacarificada ou celulose hidrolisada. Em algumas realizações da presente invenção, o microorganismo usado é um *Thraustochytrid*. Preferencialmente, o microorganismo é do gênero *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* ou *Ulkenia*. Em algumas realizações da presente invenção, o microorganismo usado é uma levedura do gênero *Yarrowia* (como, por exemplo, a *Yarrowia lipolytica*), *Cryptococcus* (tal como *Cryptococcus albidus*), *Trichosporon*, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium* ou *Rhodotorula*. O pedido de patente publicado WO 2004/101757, cujo conteúdo é integralmente incorporado ao presente pela referência, divulga exemplos dessas leveduras.

[0055] A presente invenção ainda contempla a utilização de uma combinação de dois ou mais microorganismos para a produção de um óleo

biológico ou uma mistura de óleos biológicos. Para reduzir os custos de fermentação, dois ou mais microorganismos são preferencialmente cultivados sob as mesmas condições de fermentação. Quando dois ou mais microorganismos diferentes são combinados para produzir o óleo biológico, um ou mais microorganismos podem acumular óleo durante a fermentação. Um ou mais microorganismos podem facilitar o crescimento e acúmulo de óleo para outro microorganismo, através da atividade, tais como, mas não se limitando a atividade, de desagregação dos componentes da matéria-prima nos monômeros de açúcar em uso (como, por exemplo, a sacarificação da celulose), de desagregação dos componentes da matéria-prima que inibem crescimento de um outro microorganismo (tal como a metabolização ou degradação dos componentes da matéria-prima, como a lignina, hemicelulose (por exemplo, xilana, glucuronoxilana, arabinoxilana, glucomannan, e xiloglucano), óleos vegetais, polissacarídeos extracelulares de vegetais, etc), da síntese de elementos que promovem a cultura de um outro microorganismo (tal como pela síntese de certas enzimas que facilitam a cultura do microorganismo).

[0056] Os organismos adequados para a metabolização da hemicelulose incluem, mas não estão limitados a, *Fibrobacter succinogenes* e leveduras dos gêneros *Cryptococcus* (como o *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus curvatus*), *Trichosporon*, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium* e *Rhodotorula*. Outros organismos adequados para metabolização da hemicelulose incluem espécies de *Pichia* (tal como *Pichia stipitis*), *Aeromonas*, *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Bacillus* (como o *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis* e *Bacillus lents*), *Echerichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* e organismos do gênero *Trichoderma*, organismos adequados para a metabolização da lignina incluem, mas não estão limitados a, *Phanerochaete chrysosporium* e outros fungos como os causadores da “podridão branca”. O pedido de patente publicado WO

91/018974, cujo conteúdo é integralmente incorporado ao presente pela referência, divulga exemplos de organismos que apresentam atividade hemicelulase.

[0057] São divulgados métodos adequados para o uso na presente invenção para a geração de açúcares livres e oligossacarídeos a partir da biomassa lignocelulósica, por exemplo, na publicação do pedido de patente US 2004/0005674, cujo conteúdo é integralmente incorporado ao presente pela referência. Estes métodos envolvem a conversão da biomassa lignocelulósica aos açúcares livres e pequenos oligossacarídeos com enzimas (tais como celulasas, xilanases, ligninases, amilases, proteases, lipidases e glucuronidases) que quebram a lignocelulose. Estas enzimas podem ser compradas a partir de uma fonte comercial ou produzidas de maneira recombinante, tal como pela expressão, tanto em microorganismos, fungos, ou seja, leveduras, quanto em plantas.

[0058] Microorganismos oleaginosos são preferidos para o uso na presente invenção. Conforme utilizado na presente invenção, “microorganismos oleaginosos” são definidos como microorganismos capazes de acumular mais de 20% do peso seco da célula na forma de lipídio. Em algumas realizações da presente invenção, um microorganismo produz cerca de 30% a cerca de 95% do peso de sua biomassa seca na forma lipídios. Preferencialmente, um microorganismo da presente invenção produz cerca de 35% até cerca de 93%, de cerca de 40% até cerca de 90%, de cerca de 45% até cerca de 88%), de cerca de 50% até cerca de 85%, de cerca de 55 % até cerca de 83%, de cerca de 60% até cerca de 80%, de cerca de 65% até cerca de 78%, ou cerca de 70% até cerca de 75% em peso de sua biomassa seca na forma de lipídios. Em algumas realizações da presente invenção, o microorganismo produz, pelo menos, cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de

55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65% ou pelo menos cerca de 70% em peso de sua biomassa seca como lipídeos.

[0059] Quando dois ou mais microorganismos são usados para produzir os óleos biológicos da presente invenção, um ou mais microorganismos podem produzir óleos biológicos. Em algumas realizações da presente invenção, quando dois ou mais microorganismos são combinados para produzir óleos biológicos, a relação entre a quantidade de óleo produzida por um primeiro microorganismo pela quantidade de óleo produzida por um segundo microorganismo, medida pelo peso, é de cerca de 1:9 a cerca de 1:1, de cerca de 1:9 a cerca de 2:3, de cerca de 1:9 a cerca de 3:7 ou de cerca de 1:9 a cerca de 1:4.

[0060] De preferência, um microorganismo da presente invenção produz óleo na forma de triglicerídeos em uma quantidade de cerca de 25% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 30% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 35% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 40% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 45% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 50% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 55% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 60% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 60% a cerca de 80% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 65% a cerca de 80% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 65% a cerca de 75% em peso de sua biomassa seca, ou cerca de 70% a cerca de 75% em peso de sua biomassa seca. Em algumas realizações da presente invenção, o microorganismo produz óleo na forma de triglicérides em uma quantidade de pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65% ou pelo menos

cerca de 70% em peso de sua biomassa seca.

[0061] Conforme utilizado no presente, um “triglicerídeo” é um éster de três resíduos de ácidos graxos e glicerol, com a fórmula química geral  $\text{CH}_2(\text{OOCR}^1)\text{CH}(\text{OOCR}^2)\text{CH}_2(\text{OOCR}^3)$ , onde cada um dos  $\text{OOCR}^1$ ,  $\text{OOCR}^2$  e  $\text{OOCR}^3$  representa um resíduo de ácido graxo. Em algumas realizações da presente invenção, triglicérides adequados podem conter pelo menos um PUFA. Em algumas realizações, o PUFA tem um comprimento de cadeia de pelo menos 18 carbonos. Tais PUFAs são referidos no presente como PUFAs de cadeia longa ou LC-PUFAs. Em algumas realizações, o PUFA pode ser ácido docosahexaenóico C22:6 n-3 (DHA), ácido docosapentaenóico ômega-3 C22:5 n-3 (DPA (n-3)), ácido docosapentaenóico ômega-6 C22:5 n - 6 (DPA (n-6)), ácido araquidônico C20:4 n-6 (ARA), ácido eicosapentaenóico C20:5 n-3 (EPA), ácido estearidônico (SDA), ácido linolênico (LLA), ácido alfa-linolênico (ALA), ácido gama-linolênico (GLA), ácido linoléico conjugado (CLA), ácido eicosatetraenóico (C20:4 n-3), ácido homo-alfa e gama-linolênico (C20: 3 n-6 e 20:3 n-3 ), ácido adrênico (C22:4 n-6), ácido octacosaoctenóico (C28:8), ou misturas destes. Os PUFAs também podem estar presentes em qualquer uma das formas mais comuns encontradas nos lipídios naturais, incluindo, mas não se limitando a triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, fosfolipídios, ácidos graxos livres, ou em formas naturais ou sintéticas derivadas desses ácidos graxos (por exemplo, sais de cálcio de ácidos graxos, e similares). A referência a um óleo ou outra composição que compreende triglicerídeos possuindo resíduos de PUFAs, tal como utilizado na presente invenção, pode se referir tanto a uma composição que compreende triglicerídeos que possuem apenas um único tipo de resíduo PUFA como DHA, quanto uma composição que compreende triglicerídeos que possui uma mistura de mais de um tipo de resíduos de PUFAs, tais como DHA, EPA e ARA.

[0062] Em algumas realizações da presente invenção, os

microorganismos são capazes de crescer em alta densidade. Em algumas realizações da presente invenção, os microorganismos são capazes de alcançar uma densidade celular de pelo menos cerca de 10 g/L, pelo menos cerca de 15 g/L, pelo menos cerca de 20 g/L, pelo menos cerca de 25 g/L, pelo menos cerca de 30 g/L, pelo menos cerca de 50 g/L, pelo menos cerca de 75 g/L, pelo menos cerca de 100 g/L, pelo menos cerca de 125 g/L, pelo menos cerca de 135 g/L, pelo menos cerca de 140 g/L, pelo menos cerca de 145 g/L, ou pelo menos cerca de 150 g/L. Em algumas realizações da presente invenção, os microorganismos são capazes de alcançar uma densidade celular de cerca de 10 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 15 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 20 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 25 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 30 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 50 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 75 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 100 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 125 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 130 g/L a cerca de 290 g/L, de cerca de 135 g/L a cerca de 280 g/L, de cerca de 140 g/L a cerca de 270 g/L, de cerca de 145 g/L a cerca de 260 g/L, ou de cerca de 150 g/L a cerca de 250 g/L. A alta densidade de crescimento dos microorganismos da presente invenção pode ser aumentada pelo ajuste das condições de fermentação (tais como temperatura, pH, concentração de íons e concentrações de gás).

[0063] A presente invenção fornece a produção altamente eficiente dos óleos biológicos. Em algumas realizações da presente invenção, a quantidade de óleo biológico produzido é de pelo menos cerca de 5 g/L/dia, pelo menos cerca de 10 g/L/dia, pelo menos cerca de 20 g/L/dia, pelo menos cerca de 30 g/L/dia, pelo menos cerca de 40 g/L/dia, pelo menos cerca de 50 g/L/dia, pelo menos cerca de 60 g/L/dia ou pelo menos cerca de 70 g/L/dia. Em algumas realizações da presente invenção, a quantidade de óleo biológico produzido é de pelo menos cerca de 5 g/L/dia a cerca de 70 g/L/dia, cerca de 10 g/L/dia a

cerca de 70 g/L/dia, de cerca de 20 g/L/dia a cerca de 70 g/L/dia, ou de cerca de 30 g/L/dia a cerca de 70 g/L/dia.

[0064] Em algumas realizações da presente invenção, o microorganismo utilizado para a produção do óleo biológico é um microorganismo celulolítico e, portanto, é capaz de sacarificar a celulose a partir da lignocelulose ou matéria-prima lignocelulósica. As matérias-primas celulósicas ou lignocelulósicas incluem todas as fontes que compreendem celulose. Estes incluem, mas não estão limitados a, gramíneas, cana-de-açúcar, resíduos agrícolas, resíduos de papel, despejos, madeira e qualquer organismo no reino *Viridiplantae* ou produtos derivados destes. Preferencialmente, a celulose é usada a partir de uma fonte que não seja de fontes de celulose baseadas em árvores. Os tipos de gramíneas úteis como fonte de celulose incluem, mas não estão limitados a, capim-navalha, agropiro, painços e gramíneas do tipo *Miscanthus*.

[0065] A fim de um microorganismo utilizar celulose como fonte de carbono, a celulose deve ser quebrada em seus monômeros de açúcar constituintes. A celulose é um polímero da glicose ligado por ligações beta-glicosídeo que fornece uma estrutura linear altamente estável. A quebra da celulose em monômeros de açúcar (também referida como sacarificação da celulose) é um desafio difícil e muitas tentativas foram feitas para se realizar isso. A hidrólise enzimática da celulose por celulases é uma abordagem para degradar a celulose. A hidrólise completa da celulose geralmente requer: um endoglucanase, que cliva regiões do interior de polímeros de celulose; um exoglucanase, que cliva unidades celobiose a partir das extremidades dos polímeros de celulose, e uma beta-glucosidase, que cliva a celobiose em suas subunidades de glicose. As celulases podem ter vários complexos que realizam as atividades de uma endoglucanase, um exoglucanase e uma beta-glucosidase. A *Trichoderma reesei* é um organismo importante utilizado para a produção de celulases. Outros métodos de quebrar da celulose em monômeros

de açúcar incluem perturbações termoquímicas (com ou sem perturbações mecânicas), incluindo a água quente, explosão por vapor, tratamentos com ácido e/ou explosão de fibra de amônia.

[0066] Em algumas realizações da presente invenção, o microorganismo que é cultivado para produzir o óleo biológico é o mesmo microorganismo que sacarifica a celulose. Em algumas realizações da presente invenção, dois ou mais microorganismos podem ser cultivados, simultaneamente ou sequencialmente, para produzir óleos biológicos utilizando matérias-primas contendo celulose como fonte de carbono. De acordo com a presente invenção, quando dois ou mais microorganismos são fermentados de forma simultânea ou sequencialmente, um ou mais microorganismos são capazes de sacarificar a celulose. Em algumas realizações da presente invenção, um microorganismo pode sofrer fermentação heterotrófica, na presença de uma celulase para amplificar a sacarificação da celulose durante a fermentação. Em algumas realizações, pelo menos um dos microorganismos é do reino *Stramenopile* e, preferencialmente, é um membro do grupo comumente denominado de *Thraustochytrids*.

[0067] Os microorganismos adequados para o uso na presente invenção podem também ser tolerantes a altas temperaturas e/ou ambientes altamente ácidos ou básicos de modo que seu crescimento não é inibido e, em alguns casos, é ainda reforçado pelas altas temperaturas e/ou meios ácidos. Em algumas realizações da presente invenção, um microorganismo é cultivado por fermentação heterotrófica utilizando matérias-primas contendo celulose a uma temperatura e/ou um pH que facilita a degradação da celulose. Em algumas realizações da presente invenção, a fermentação é realizada a uma temperatura de cerca de 15°C a 70°C, cerca de 20°C a 40°C, ou cerca de 25°C a 35°C. Em outras realizações da presente invenção, a fermentação é realizada em um pH de cerca de 3 a cerca de 11, de cerca de 3 a cerca de 10, de cerca

de 4 a cerca de 9,5, de cerca de 4 a cerca de 9, de cerca de 5 a cerca de 7 ou cerca de 6 a cerca de 9. O pré-tratamento das matérias-primas contendo celulose utilizando , por exemplo, perturbações químicas e/ou mecânicas e explosões de fibra de amônia, também pode ser realizado antes de utilizar a matéria-prima na produção dos óleos biológicos da presente invenção. Alternativamente, nenhum pré-tratamento mencionado é necessário.

[0068] Alguns exemplos de métodos de pré-tratamento da matéria-prima estão divulgados nas publicações de patentes US 2007/0161095, WO 05/053812, WO 06/086757, US 2006/0182857, US 2006/177551, US 2007/0110862, WO 06/096834, WO 07/055735, US 2007/0099278, WO 06/119318, US 2006/0172405 e US 2005/0026262, cujos conteúdos são incorporados ao presente pela referência em sua totalidade.

[0069] Exemplos de enzimas adequadas para a digestão da celulose são divulgados nas patente ou pedidos de patentes publicados US 2003/0096342, WO 03/012109, US 7059993, WO 03/012095, WO 03/012090, US 2003/0108988, US 2004/0038334, US 2003/0104522, EP 1 612 267 e WO 06/003175, cujos conteúdos são integralmente incorporados ao presente pela referência.

[0070] Em algumas realizações da presente invenção, a matéria-prima celulósica que é usada para cultivar um microorganismo é composta de celulose em uma quantidade de cerca de 5% a cerca de 100%, de cerca de 10% a cerca de 95%, de cerca de 20% a cerca de 90% , de cerca de 30% a cerca de 85%, de cerca de 40% a cerca de 80%, de cerca de 50% a cerca de 75%, ou cerca de 60% a cerca de 70% do peso seco da matéria-prima de carbono. Em algumas realizações da presente invenção, a matéria-prima celulósica compreende celulose em uma quantidade de pelo menos cerca de 5%, pelo menos, cerca de 10%, pelo menos, cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca 50%, pelo menos cerca

de 60%, ou pelo menos cerca de 70% do peso seco da matéria-prima de carbono.

[0071] Preferencialmente, o microorganismo utilizado na presente invenção é resistente à degradação dos componentes da matéria-prima tais como, lignina, xilana, hemicelulose, óleo vegetal, polissacarídeos extracelulares vegetais e combinações destes. A degradação ou resistência a esses componentes da matéria-prima garante que o desempenho da fermentação do microorganismo não será inibido pela presença desses componentes.

[0072] Em algumas realizações da presente invenção, a matéria-prima celulósica utilizada para cultivar um microorganismo é composta de cerca de 1% a cerca de 50%, de cerca de 5% a cerca de 40%, ou cerca de 10% a cerca de 30% em peso de um componente selecionado a partir da lignina, hemicelulose ou uma combinação das duas. Em algumas realizações da presente invenção, a matéria-prima celulósica utilizada para cultivar um microorganismo é composta por pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, ou pelo menos cerca de 30% em peso de um componente selecionado a partir da lignina, hemicelulose ou uma combinação das duas.

[0073] Organismos adequados podem ser obtidos a partir de uma variedade de fontes disponíveis, incluindo a coleta a partir do ambiente natural. Conforme utilizado no presente, qualquer organismo, ou qualquer tipo de organismo específico, incluindo cepas selvagens, mutantes ou tipos recombinantes. Condições de crescimento para a cultura ou cultivo destes organismos são conhecidas no estado da técnica, e as condições de crescimento adequadas para pelo menos alguns destes organismos são divulgadas, por exemplo, na Patente US 5.130.242, Patente US 5.407.957, Patente US 5.397.591, Patente US 5.492.938, Patente US 5.711.983 e Patente US 6.607.900, as quais são incorporadas pela referência em sua totalidade.

Quando os óleos microbianos são utilizados, os microorganismos são cultivados em um meio eficaz, definidos como qualquer meio capaz de promover a produção de óleo. Preferencialmente, o meio eficaz também promove rápido crescimento microbiano. Os microorganismos podem ser cultivados em modos de fermentação convencionais, que incluem, mas não estão limitados a, de batelada (*batch*), de batelada alimentada (*fed-batch*), semi-contínuo e contínuo. Conforme utilizado na presente invenção, um modo “semi-contínuo” refere-se a um modo de fermentação em que uma parte da cultura de fermentação contendo microorganismos não é coletada do fermentador após a conclusão do processo de fermentação. A porção de cultura de fermentação restante no fermentador pode servir para inocular o processo de fermentação subsequente. Em algumas realizações da presente invenção, cerca de 1% a cerca de 50%, cerca de 1% a cerca de 25%, cerca de 1% a cerca de 15%, cerca de 1% a cerca de 10% ou cerca de 2% a cerca de 8% em volume da cultura de fermentação não é colhida após a conclusão do processo de fermentação, e é deixada no fermentador para inocular o processo de fermentação subsequente.

[0074] Em algumas realizações da presente invenção, o processo de fermentação compreende uma primeira etapa que visa o acúmulo de biomassa do microorganismo e uma segunda etapa que visa o acúmulo de lipídeos pelo microorganismo. Preferencialmente, não há limitação de nutrientes durante a etapa de acúmulo de biomassa. A etapa de acúmulo de lipídeos é conduzida de preferência com limitação de nitrogênio com um suprimento de carbono.

[0075] Os métodos da presente invenção para produzir biodiesel podem compreender (a) a cultura de um microorganismo utilizando um sistema de fermentação que compreende uma etapa de semeadura contínua e uma etapa de produção lipídica para produzir um óleo biológico; e (b) a conversão do óleo biológico em biodiesel através de métodos conhecidos no estado da técnica, tal

como a transesterificação do óleo biológico para produzir biodiesel. A etapa de semeadura contínua visa o acúmulo de biomassa e é realizada pelo fornecimento de alimentação contínua de nutrientes no tanque de semeadura (o tanque com o inóculo inicial). O caldo fermentado do tanque de semeadura é retirado e transferido para um tanque da etapa de produção de lipídeos, que pode ser conduzido como um processo de batelada alimentada em que uma fonte de carbono é suplementada ao processo de batelada para manter uma concentração de açúcar desejado durante a execução.

[0076] Um processo similar de fermentação de duas etapas pode ser usado para produzir óleo biológico para a produção do biocombustíveis para aviação. Em algumas realizações da presente invenção, os métodos de produção do biocombustível para aviação compreendem a conversão do óleo biológico produzido usando este sistema de fermentação em biocombustível para aviação por métodos conhecidos no estado da técnica, utilizando um processos como o craqueamento para ajudar na transformação do óleo biológico em biocombustível para aviação.

[0077] O processo de fermentação de duas etapas aumenta a eficiência do processo de produção do óleo biológico e, portanto, contribui para reduzir o custo da produção de biocombustível à base de lipídios. Este sistema de fermentação melhorado para a produção de biocombustível à base de lipídio é particularmente vantajoso na maximização da eficiência, produção em larga escala de óleos biológicos e, portanto, faz uma contribuição significativa na produção de biocombustíveis à base de lipídios a partir de óleos biológicos mais viáveis comercialmente. O processo de fermentação em duas etapas pode ser utilizado para produzir óleo biológico com alto ou baixo teor de ácidos graxos poliinsaturados, dependendo dos requisitos para uma aplicação específica.

[0078] Em algumas realizações da presente invenção, a etapa de

acúmulo de biomassa (tal como a etapa de semeadura contínua) produz a biomassa do microorganismo de tal forma que cerca de 10% a cerca de 95%, cerca de 20% a cerca de 95%, cerca de 30% a cerca de 95% , cerca de 40% a cerca de 95%, ou cerca de 50% a cerca de 95% da produção total de biomassa do microorganismo é obtida durante a etapa de acúmulo de biomassa. Em outras realizações da presente invenção, cerca de 60% a cerca de 95%, cerca de 70% a cerca de 95%, ou cerca de 80% a cerca de 95% da produção total de biomassa do microorganismo é obtida durante a etapa de acúmulo de biomassa. Em algumas realizações da presente invenção, a etapa de acúmulo de biomassa produz uma biomassa do microorganismo de modo que pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95% da produção total de biomassa do microorganismo é conseguida durante a etapa de acúmulo de biomassa. Preferencialmente, a cerca de 50% a cerca de 95% da produção total de biomassa do microorganismo é alcançada durante a etapa de acúmulo de biomassa.

[0079] Em algumas realizações da presente invenção, a etapa de acúmulo de lipídeo produz lipídeos de tal forma que cerca de 10% a cerca de 95%, cerca de 20% a cerca de 95%, cerca de 30% a cerca de 95% , cerca de 40% a cerca de 95%, ou cerca de 50% a cerca de 95% da produção total de lipídeo do microorganismo é alcançada durante a etapa de acúmulo de lipídeo. Em outras realizações da presente invenção, cerca de 60% a cerca de 95%, cerca de 70% a cerca de 95%, ou cerca de 80% a cerca de 95% da produção total de lipídeo do microorganismo é alcançada durante a etapa de acúmulo de lipídeo. Em algumas realizações da presente invenção, a etapa de acúmulo de lipídeo produz lipídeos de modo que pelo menos cerca de 10%, pelo menos

cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95% da produção total de lipídeo do microorganismo é obtida durante a etapa de acúmulo de lipídeo. Preferencialmente, a cerca de 50% a cerca de 95% da produção total de lipídeo do microorganismo é atingida durante a etapa de acúmulo de lipídeo.

[0080] Microorganismos geneticamente modificados são também preferidos para o uso na presente invenção. Microorganismos da presente invenção podem ser geneticamente modificados para melhorar a sua capacidade de produzir óleos biológicos na redução de custos (por exemplo, através de uma maior capacidade de utilizar matéria-prima à base de celulose como principal fonte de carbono). Estes microorganismos geneticamente modificados podem incluir, mas não estão limitados a, microorganismos que foram geneticamente modificados para ter uma melhor capacidade de sacarificação da matéria-prima celulose ou celulósica, para ter um aumento na produção de óleo, para ter a capacidade de degradar a lignina ou ser resistente a lignina, ou crescer em condições de cultivo que não são ideais para o organismo correspondente do tipo selvagem (como, por exemplo, altas temperaturas ou meios altamente ácidos). Por exemplo, um microorganismo pode ser geneticamente modificado para introduzir ou reforçar as atividades de uma endoglucanase, uma exoglucanase, e/ou uma beta-glicosidase.

[0081] Genes de organismos utilizados para desenvolver celulases podem ser introduzidos em um microorganismo para aumentar a sua capacidade de sacarificar a celulose. Por exemplo, genes que codificam os componentes de celulases de organismos dos gêneros *Trichoderma*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermobifida*, *Acidothermus*, *Schizochytrium*, ou *Thraustochytrium* podem ser introduzidos em um microorganismo da presente invenção através de técnicas

genéticas recombinantes para a produção de um microorganismo que é capaz de sacarificar diretamente a celulose. Preferencialmente, os genes que codificam componentes da celulase das espécies *Trichoderma reesei*, *Clostridium thermocellum*, *Acidothermus cellulolyticus*, ou *Schizochytrium aggregatum* são introduzidos e expressos em microorganismos da presente invenção. Em algumas realizações da presente invenção, uma celulase de um organismo é clonado em um organismo diferente.

[0082] Técnicas de transformação genética de microorganismos são bem conhecidas no estado da técnica e são discutidas, por exemplo, em Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press. Uma técnica geral para a transformação de dinoflagelados, que pode ser adaptada para o uso com o *Cryptocodinium cohnii*, é descrita em detalhes em Lohuis e Miller, *The Plant Journal* (1998) 13 (3): 427-435. Uma técnica geral de transformação genética do *Thraustochytrids* é descrita em detalhes na publicação do Pedido de Patente US 20030166207, publicado em 4 setembro de 2003.

[0083] Em algumas modalidades da presente invenção, a fermentação dos microorganismos para produzir óleos biológicos é realizada sob baixas concentrações de oxigênio dissolvido. A capacidade dos microorganismos para crescer e produzir óleo em baixas concentrações de oxigênio dissolvido reduz a energia que entrada na fermentação e, portanto, também reduziria o custo da fermentação. Em algumas realizações da presente invenção, o crescimento da biomassa de microorganismos (etapa de acúmulo da biomassa) é realizada com uma concentração de oxigênio dissolvido de cerca de 4% a cerca de 100%, de cerca de 10% a cerca de 100%, de cerca de 10% a cerca de 80%, de cerca de 10% a cerca de 70%, de cerca de 10% a cerca de 60%, de cerca de 15% a cerca de 50%, ou cerca de 20% a cerca de 40%. A produção de óleo biológico pelo microorganismo (etapa de acúmulo de lipídios) pode ser realizada a uma

concentração de oxigênio dissolvido de, por exemplo, 0% a cerca de 10%, de 0% a cerca de 8%, de cerca de 1% a cerca de 5 %, ou cerca de 1% a cerca de 3%.

[0084] Para reduzir os custos energéticos associados com o arrefecimento dos fermentadores, os microorganismos utilizados na presente invenção são preferencialmente tolerantes a temperatura sob uma ampla variação de temperaturas. Em algumas realizações da presente invenção, os microorganismos podem crescer e produzir óleo a uma temperatura de cerca de 15°C a 45°C, cerca de 20°C a 45°C, cerca de 25°C a 45°C, cerca de 30°C a 45°C, cerca de 35°C a 45°C.

[0085] Convencionalmente, a fermentação de um microorganismo é geralmente realizado em um ambiente estéril para evitar contaminantes que possa interferir com o crescimento da biomassa e/ou acúmulo de lipídios do microorganismo. A execução da fermentação sob condições estéreis aumenta o custo de produção do óleo biológico a partir de microorganismos. A fim de minimizar o custo da fermentação, a presente invenção fornece a solução inesperada de produzir óleos biológicos pela fermentação em fermentadores não estéreis. O uso de fermentadores não estéreis para produzir óleo a partir de um microorganismo é especialmente adequado para a produção de óleos para fins de biocombustíveis á base de lipídeos, uma vez que reduz significativamente os custos de produção do óleo e torna a produção de biocombustíveis à base de lipídeos mais viável comercialmente. Fermentadores não estéreis podem ser usados para produzir óleos biológicos com alto ou baixo teor de ácidos graxos poliinsaturados, dependendo dos requisitos para uma aplicação específica.

[0086] Preferencialmente, fermentadores de baixo custo poderiam ser empregados na fermentação, incluindo fermentadores de polímero reforçados com fibra, fermentadores compósitos de matriz de metal, cerâmica matriz fermentadores compostos de matriz metálica, fermentadores compostos de

matriz cerâmica, fermentadores compostos de termoplásticos, fermentadores de metal, fermentadores de aço carbono revestidos de epóxi, fermentadores de aço carbono revestidos de plástico, fermentadores de plástico, fermentadores de fibra de vidro, fermentadores de concreto e fermentadores feitos de polímeros (tal como o polipropileno (PP), polietileno de alta densidade (PEAD), policarbonato (PC), poliestireno (PS), cloreto de polivinila (PVC), kynar e nylon). O fermentador de baixo custo também pode ser feito de uma combinação dos materiais acima citados. A limpeza de baixo custo de tanques pode também ser utilizada de acordo com a presente invenção para reduzir ainda mais os custos da fermentação. A limpeza de baixo custo de tanques inclui, mas não está limitada a, utilização de metóxido ou etóxido para limpar quimicamente os tanques de fermentação.

[0087] Em algumas realizações da presente invenção, o óleo biológico é produzido em uma taxa de cerca de 5 g/L/ dia até cerca de 70 g/L/dia em um fermentador não estéril. Preferivelmente, a quantidade de óleo biológico produzido em um fermentador não estéril é de pelo menos cerca de 5 g/L/dia, pelo menos cerca de 10 g/L/dia, pelo menos cerca de 20 g/L/dia, pelo menos cerca de 30 g/L/dia, pelo menos cerca de 40 g/L/dia, pelo menos cerca de 50 g/L/dia, pelo menos cerca de 60 g/L/dia ou pelo menos cerca de 70 g/L/dia. Em algumas realizações da presente invenção, a quantidade de óleo biológico produzido em um fermentador não estéril é de cerca de 10 g/L/dia a cerca de 70 g/L/dia, cerca de 20 g/L/dia a cerca de 70 g/L/dia, ou de cerca de 30 g/L/dia a cerca de 70 g/L/dia.

[0088] A cultura do microorganismo em um fermentador estéril atinge preferencialmente uma alta densidade celular de pelo menos cerca de 10 g/L, pelo menos cerca de 15 g/L, pelo menos cerca de 20 g/L, pelo menos cerca de 25 g/L, pelo menos cerca de 30 g/L, pelo menos cerca de 50 g/L, pelo menos cerca de 75 g/L, pelo menos cerca de 100 g/L, pelo menos cerca de 125 g/L,

pelo menos cerca de 135 g/L, pelo menos cerca de 140 g/L, pelo menos cerca de 145 g/L, pelo menos cerca de 150 g/L ou pelo menos cerca de 200 g/L. Em algumas realizações da presente invenção, os microorganismos submetidos à fermentação em um fermentador estéril são capazes de alcançar uma densidade celular de cerca de 10 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 15 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 20 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 25 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 30 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 50 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 75 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 100 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 125 g/L a cerca de 300 g/L, de cerca de 130 g/L a cerca de 290 g/L, de cerca de 135 g/L a cerca de 280 g/L, de cerca de 140 g/L a cerca de 270 g/L, de cerca de 145 g/L a cerca de 260 g/L, ou de cerca de 150 g/L a cerca de 250 g/L.

[0089] Em algumas modalidades da presente invenção, as mudanças nas condições de fermentação do microorganismo (como pH, temperatura, concentração do oxigênio dissolvido, relação de íons, etc) podem ser utilizadas para alterar o perfil de ácidos graxos do óleo resultante em função do uso pretendido do óleo biológico. De acordo com o uso pretendido dos óleos biológicos da presente invenção, as condições de fermentação podem ser ajustadas, por exemplo, para promover ou impedir a produção de lipídios na forma de triglicerídeos pelos microorganismos, para promover ou impedir a produção de ácidos graxos específicos ou misturas de ácidos graxos pelos microorganismos (como ácidos graxos de cadeia longa específica ou grau de insaturação), para promover ou impedir a produção de óleos que fornecem um nível alto ou baixo de energia por unidade de volume do óleo, ou promover ou impedir o acúmulo de determinados subprodutos do óleo produzido pelos microorganismos. Diferentes utilizações dos óleos biológicos da presente invenção para fins de biocombustíveis à base de lipídios incluem, sem se limitar a, utilização como combustível para aquecimento, biodiesel utilizado em

transportes, combustível para aviação e aditivos para combustíveis. Em algumas realizações da presente invenção, o deutério pode ser utilizado no meio de fermentação para facilitar a produção de volume ultra-baixo, valor muito elevado, combustíveis ou lubrificantes especiais. Em algumas realizações da presente invenção, a transformação de óleos biológicos em biocombustíveis baseados em lipídios envolve processos químicos e técnicas de refinamento conhecidas no estado da técnica que também pode produzir ou serem usadas para produzir compostos químicos especiais semelhantes aos destilados do petróleo (tais como componentes plásticos). O lucro da venda destes produtos químicos especiais poderiam também compensar os custos de produção dos biocombustíveis baseados em lipídeos. Vários outros usos dos óleos biológicos são contemplados no escopo da presente invenção. Por exemplo, os óleos biológicos da presente invenção podem ser usados em qualquer alimento adequado, nutricional ou produtos farmacêuticos.

[0090] A presente invenção também fornece métodos para fermentar microorganismos em tanques de fermentação que estão submersos em um líquido, tal como água para o resfriamento. Em realizações preferidas da presente invenção, as instalações de fermentação podem ser configuradas em série para minimizar o consumo de energia. Por exemplo, o efluente de arrefecimento e a difusão de gases de escape de uma série de fermentadores poderiam ser usados como uma fonte (ou fonte parcial) de água e gás de resfriamento, respectivamente, para os fermentadores que estão próximos em linha, em série ou a montante em série. O sistema de fermentação pode ser configurado para que a água de arrefecimento possa vir de um corpo natural de água tal como um lago, lagoa ou mar. O sistema de fermentação pode ser projetado de tal modo para que os sistemas de arrefecimento dos fermentadores estejam ligados em série de modo que o arrefecimento da água efluente do primeiro fermentador ou de um conjunto de fermentadores em série

possa ser utilizado como uma fonte de água para a refrigeração de um segundo fermentador ou conjunto de fermentadores em série. De maneira semelhante, o sistema de fermentação pode ser projetado de tal modo para que o fornecimento de gás dos fermentadores esteja ligado em série de modo que a difusão exaurida a partir do primeiro fermentador ou de um conjunto de fermentadores em série possa ser utilizado como uma fonte de gás para o segundo fermentador ou conjunto de fermentadores em série. O primeiro fermentador ou conjunto de fermentadores podem estar antes ou depois na série em relação ao segundo fermentador ou conjunto de fermentadores. A fermentação da presente invenção é preferencialmente realizada em modos de fermentação de batelada (*batch*), de batelada alimentada (*fed-batch*), semi-contínuo e contínuo.

[0091] Enquanto em algumas realizações da invenção, os óleos biológicos compreendem triglicerídeos podem ser um óleo bruto (discutida mais detalhadamente abaixo), outros óleos úteis na presente invenção podem ser recuperados a partir de suas fontes por qualquer meio adequado conhecido pelos técnicos hábeis no assunto. Por exemplo, os óleos podem ser recuperados por extração com solventes como o clorofórmio, hexano, diclorometano, metanol e similares, por extração com fluido supercrítico, ou por métodos de extração sem solventes. Em algumas realizações da presente invenção, os óleos biológicos são recuperados pela extração com hexanos. Alternativamente, os óleos podem ser extraídos utilizando técnicas de extração, tal como descrito na Patente US 6.750.048 e pedido de Patente US 01/01806, ambos depositados em 19 de janeiro de 2001, e intitulado “Processo de Extração Sem Solventes”, sendo que ambos são integralmente incorporados ao presente pela referência. Técnicas adicionais de extração e/ou de purificação são ensinadas no pedido de Patente PCT/IBO1/00841, intitulado “Método de fracionamento de óleo e matérias-primas nativas contendo lipídeos

polares” depositado em 12 de abril de 2001; pedido de Patente PCT/IBO1/00963, intitulado “Método de fracionamento de óleo e matérias-primas nativas contendo lipídeos polares utilizando solventes orgânicos solúveis em água e centrifugação” depositado em 12 de abril de 2001; pedido de patente provisório 60/291.484, intitulado “Produção e utilização de uma fração polar rica em lipídeos contendo ácido estearidônico e ácido gama linolênico a partir das espécies vegetais e micróbios” depositado em 14 de maio de 2001; pedido de patente Provisório 60/290.899, intitulado “Produção e Uso de uma fração lipídica polar contendo ácidos graxos Ômega-3 e/ou Ômega-6 altamente insaturados a partir de micróbios, sementes vegetais e organismos marinhos geneticamente modificados” depositado em 14 de maio de 2001; pedido de Patente US 6.399.803, intitulado “Processo para a separação de um triglicerídeo que compreende um resíduo de ácido docosahexaenóico a partir de uma mistura de triglicérides” publicado em 4 de junho de 2002 e depositado em 17 de fevereiro de 2000, e pedido de Patente PCT US01/01010 intitulado “processo para fazer uma mistura enriquecida de ésteres de ácidos graxos poliinsaturados” depositado em 11 de janeiro de 2001, todos os quais são incorporados ao presente pela referência na sua totalidade. Os óleos extraídos podem ser evaporados sob pressão reduzida para produzir uma amostra de material de óleo concentrado. Processos para o tratamento enzimático da biomassa para a recuperação de lipídios são divulgados no pedido e Patente Provisório US 60/377.550, intitulado “LIPÍDEOS DE ALTA QUALIDADE E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DESTES PELA LIBERTAÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DA BIOMASSA”, depositado em 3 de maio de 2002; pedido de Patente PCT/US03/14177, intitulado “LIPÍDEOS DE ALTA QUALIDADE E MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO PELA LIBERTAÇÃO ENZIMÁTICA DA BIOMASSA”, depositado em 5 de maio de 2003; pedido de patente copendente US 10/971.723, intitulado “LIPÍDEOS DE

ALTA QUALIDADE E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DESTES PELA LIBERAÇÃO APARTIR DA BIOMASSA”, depositado em 22 de outubro de 2004; pedido de Patente EP 0776356 e pedido de Patente US 5.928.696, ambos, intitulados “Processo para a extração de produtos nativos que não são solúveis em água a partir de misturas de substâncias nativas por força centrífuga”, as divulgações dos quais são incorporadas ao presente pela referência em sua totalidade. Os óleos podem ser extraídos por prensagem.

[0092] Em algumas realizações, um óleo obtido a partir de uma fonte descrita anteriormente pode servir como produto base para novas alterações (como transesterificação ou craqueamento) de acordo com os métodos da presente invenção, mesmo que não tenha sido submetido a tratamento convencional. Exemplos de tais processos convencionais que podem ser evitados incluem o refinamento (por exemplo, refinamento físico, refinamento por silício ou refinamento cáustico), dessolventização, desodorização, winterização, filtração a frio e/ou branqueamento. Assim, em algumas realizações, os óleos contendo triglicérides não foram submetidos a um ou mais tratamentos selecionados a partir do refinamento, dessolventização, desodorização, winterização, filtração a frio e branqueamento e em outras realizações, os óleos não foram submetidos a qualquer tratamento de refinamento, dessolventização, desodorização, winterização, filtração a frio e branqueamento.

[0093] Em algumas realizações, o óleo pode ser isolado a partir de um microorganismo pelo uso de técnicas normais, sem necessitar de um refinamento ou purificação adicional. Por exemplo, o óleo pode ser um óleo microbiano que foi apenas submetido a extração com solvente, tal como extração com hexano, extração com isopropanol, ou similares. Em algumas realizações da presente invenção, o óleo pode ser isolado a partir de um microorganismo utilizando métodos físicos e/ou mecânicos de extração (tal

como através do uso de um homogeneizador, ou por prensagem), sem estar sujeito a um refinamento ou purificação adicional.

[0094] Em outras realizações, as composições compreendem triglicérides que possuem resíduos de ácidos graxos poliinsaturados, tal como os óleos descritos acima, podem ser submetidas a etapas de processamento como, por exemplo, a refinação, dessolventização, desodorização, winterização, filtração a frio e/ou branqueamento. Tais óleos “processados” incluem óleos microbianos que foram submetidos a extração com solventes e uma ou mais destas etapas adicionais de processamento. Em algumas realizações, os óleos são minimamente processados. Óleos “minimamente processados” incluem óleos microbianos que foram submetidos a extração com solventes e a filtração. Em algumas realizações, os óleos minimamente processados são adicionalmente submetidos a winterização.

[0095] Em algumas realizações da presente invenção, um método semelhante ao FRIOLEX® (Westfalia Separator Industry GmbH, Alemanha), é usado para extrair os óleos biológicos produzidos pelos microorganismos. O FRIOLEX® é um processo de extração de óleo físico a base de água, em que as matérias-primas que contêm óleo podem ser usadas diretamente para a extração de óleo sem o uso de qualquer método convencional de extração com solvente. Neste processo, um solvente orgânico solúvel em água pode ser utilizado como um processo auxiliar e o óleo é separado do caldo de matéria-prima pela separação por densidade usando a gravidade ou força centrífuga. As publicações dos pedidos de Patentes WO 01/76715 e WO 01/76385, o conteúdo dos quais são incorporados ao presente pela referência em sua totalidade, divulgam métodos de extração

[0096] Após o óleo ser extraído, o óleo pode ser recuperado ou separado dos componentes não-lipídicos por qualquer método adequado conhecido no estado da técnica. Em realizações preferidas da presente invenção, técnicas

físicas e/ou mecânicas de baixo custo são utilizadas para separar as composições contendo lipídios das composições não-lipídicas. Por exemplo, se várias fases ou frações são criadas pelo método de extração utilizado para extrair o óleo, quando uma ou mais fases ou frações contêm lipídios, um método para recuperar as fases ou frações contendo lipídios pode envolver a remoção física das fases ou frações contendo lipídios a partir das fases ou frações não contendo lipídios, ou vice-versa. Em algumas realizações da presente invenção, um método do tipo FRIOLEX<sup>®</sup> tipo é utilizado para extrair os lipídios produzidos pelos microorganismos e a fase leve rica em lipídios é, em seguida, separada fisicamente da fase pesada rica em proteínas (tais como a desnatação da fase rica em lipídios que está acima da fase pesada rica em proteínas após a separação por densidade).

[0097] Os óleos biológicos produzidos pelos microorganismos da presente invenção podem ser recuperados de autólise ou pela lise induzida dos microorganismos, expondo os microorganismos a uma condição, incluindo, mas não se limitando a um determinado pH, uma determinada temperatura, a presença de uma enzima, a presença de um detergente, rupturas físicas, ou uma combinação destas condições. Em algumas realizações da presente invenção, um micro-organismo é exposto a condições que promovem a autólise ou lise induzida após a produção de óleo em uma quantidade de cerca de 30% a cerca de 90% do peso de sua biomassa seca, de cerca de 40% a cerca de 90% em peso de sua biomassa seca, de cerca de 50% a cerca de 90% do peso de sua biomassa seca, de cerca de 60% a cerca de 90% do peso de sua biomassa seca, de cerca de 65% a cerca de 85% em peso de suas biomassa seca, de cerca de 70% a cerca de 85% em peso de sua biomassa seca, ou cerca de 75% a cerca de 80% do peso de sua biomassa seca. Em outras realizações da presente invenção, um microorganismo é exposto a condições que promovem a autólise ou lise induzida após a produção de óleo em uma

quantidade de cerca de pelo menos 30%, cerca de pelo menos 40%, cerca de pelo menos 50%>, cerca de pelo menos 60%, cerca de pelo menos 70%, ou pelo menos cerca de 75% em peso de sua biomassa seca. Em algumas realizações da presente invenção, a lise ou autólise do microorganismo é realizada pelo uso de forças mecânicas. Em algumas realizações da presente invenção, a lise ou autólise do microorganismo é seguida pela separação mecânica dos lipídeos a partir das composições não lipídicas.

[0098] Enzimas adequadas que podem ser utilizadas para induzir a lise dos microorganismos produtores de óleo incluem, mas não estão limitados a, enzimas disponíveis comercialmente ou misturas de enzimas como, por exemplo, proteinase K ou Alcalase. A modificação genética de um microorganismo para introduzir atividades de uma enzima que induz a lise de outro microorganismo ou que induz a autólise é contemplada no escopo da presente invenção. Em algumas realizações da presente invenção, os microorganismos produtores de óleo sofrem lise induzida na presença de um detergente como, por exemplo, detergentes iônicos (catiônico e aniônico), detergentes não-iônico, detergentes anfóteros, ou combinações destes. Em outras realizações da presente invenção, os métodos de perturbação física, tal como moagem mecânica, homogeneização de líquidos, uso de ondas sonoras de alta frequência na sonicação, métodos de ciclos de congelamento e descongelamento, prensagem, extrusão ou moagem podem ser usadas para induzir a lise dos microorganismos produtores de óleo. Preferencialmente, a extração dos óleos ocorrerá nos fermentadores no final da fermentação pela lise dos microorganismos produtores de óleo no próprio tanque.

[0099] Uma vez que os óleos biológicos são produzidos de acordo com a presente invenção, vários métodos conhecidos no estado da técnica podem ser utilizados para transformar óleos biológicos em ésteres de ácidos graxos para uso como biodiesel, biocombustível para a viação, ou como ingredientes para

alimentos ou produtos farmacêuticos. Em algumas realizações da presente invenção, a produção de ésteres de ácidos graxos compreende a transesterificação dos óleos biológicos produzidos pelo microorganismo. Em algumas realizações da presente invenção, a extração do óleo a partir dos microorganismos e da transesterificação do óleo pode ser realizada simultaneamente, em um método de uma etapa. Por exemplo, a cultura que contém os microorganismos produtores de óleo pode ser exposta a condições ou tratamentos (ou uma combinação de condições ou tratamentos) que promove a extração do óleo e a transesterificação do óleo. Tais condições ou tratamentos podem incluir, mas não se limitam a, pH, temperatura, pressão, presença de solventes, presença de água, presença de catalisadores ou enzimas, presença de detergentes e forças físicas/mecânicas. Dois conjuntos de condições ou tratamentos podem ser combinados para produzir um método de extração de uma etapa e transesterificação do óleo, onde um conjunto de condições ou tratamentos promove favoravelmente a extração do óleo e o outro conjunto de condições ou tratamentos promove favoravelmente a transesterificação do óleo, contanto que os dois conjuntos de condições ou tratamentos possam ser combinados sem causar uma redução significativa na eficiência tanto da extração quanto da transesterificação do óleo. Em algumas realizações da presente invenção, a hidrólise e a transesterificação podem ser realizadas diretamente da biomassa de células inteiras. Em outras realizações da presente invenção, a extração do óleo é realizada como uma etapa que é separada da etapa de transesterificação do óleo.

[00100] Preferencialmente, tais reações de transesterificação são executadas usando catalisadores ácidos ou básicos. Em algumas realizações da presente invenção, métodos para a transesterificação dos óleos biológicos em ésteres de ácidos graxos para uso como biodiesel ou como ingredientes para alimentos ou produtos farmacêuticos envolvem a reação dos óleos

biológicos contendo triglicérides na presença de um álcool e uma base para produzir ésteres dos resíduos de ácidos graxos a partir dos triglicerídeos.

[00101] Alcoóis apropriados para o uso na presente invenção incluem qualquer álcool alquila inferior contendo de 1 a 6 átomos de carbono (ou seja, um álcool alquila C<sub>1-6</sub>, tais como metil, etil, isopropil, butil, pentil, alcoóis hexil e isômeros destes). Sem se vincular a teoria, acredita-se que, em algumas realizações da presente invenção, o uso de alcoóis alquílicos inferiores nos métodos da presente invenção produz ésteres alquílicos inferiores de resíduos de ácidos graxos. Por exemplo, o uso do etanol produz ésteres etílicos. Em certas realizações, o álcool é metanol ou etanol. Nestas realizações, o éster de ácido graxo produzido é um éster metílico e um éster etílico do resíduo de ácidos graxos, respectivamente. Nos processos da presente invenção, o álcool normalmente compreende de cerca de 5 % em peso a cerca de 70 % em peso, de cerca de 5 % em peso a cerca de 60 % em peso, de cerca de 5 % em peso a cerca de 50 % em peso, de cerca de 7 % em peso a cerca de 40 % em peso, de cerca de 9 % em peso, a cerca de 30 % em peso ou cerca de 10 % em peso a cerca de 25 % em peso da mistura da composição de óleo, o álcool e a base. Em certas realizações, a composição e a base podem ser adicionadas tanto a etanol puro quanto a metanol puro. Em geral, a quantidade de álcool utilizado pode variar de acordo com a solubilidade do óleo ou composição contendo triglicerídeos no álcool.

[00102] Qualquer base conhecida no estado da técnica que seja adequada para uso como reagente pode ser utilizada na presente invenção. A base da fórmula RO-M, onde M é um cátion monovalente e RO é um alcóxido de um álcool C<sub>1-6</sub> alquila e particularmente adequada para a presente invenção. Exemplos de bases adequadas incluem sódio elementar, metóxido de sódio, etóxido sódio, metóxido de potássio, e etóxido potássio. Em algumas realizações, a base é etóxido de sódio. Nos processos da presente invenção, a

base é tipicamente adicionada em uma quantidade de cerca de 0,05 a cerca de 2,0 equivalentes molares de triglicérides, cerca de 0,05 a cerca de 1,5 equivalentes molares de triglicérides, cerca de 0,1 a cerca de 1,4 equivalentes molares de triglicérides, cerca de 0,2 a cerca de 1,3 equivalentes molares de triglicérides, ou a partir de cerca de 0,25 a cerca de 1,2 equivalentes molares de triglicérides para a etapa de reação com a composição e o álcool.

[00103] A composição contendo triglicerídeos, o álcool e a base são reagidos juntos a uma temperatura e por um período de tempo que permite a produção de um éster de resíduos de ácido graxo e de álcool. Tempos de reação e temperaturas adequadas podem ser determinadas por um técnico hábil no assunto para produzir um éster. Sem a intenção pretensão de se vincular a teoria, acredita-se que os resíduos de ácidos graxos são clivados a partir da estrutura do glicerol da triglicéride e os ésteres de cada resíduo de ácidos graxos são formados durante a etapa de reação. Em certas realizações, a etapa de reação da composição na presença de um álcool e uma base é realizada a uma temperatura de cerca de 20°C a cerca de 140°C, de cerca de 20°C a cerca de 120°C, de cerca de 20°C a cerca de 110°C, de cerca de 20°C a cerca de 100°C, ou cerca de 20°C a cerca de 90°C. Em outras realizações, a etapa de reação da composição na presença de um álcool e uma base é realizada a uma temperatura de pelo menos cerca de 20°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 105°C ou 120°C. Em algumas realizações da presente invenção, a etapa de reação da composição na presença de um álcool e uma base é realizada a uma temperatura de cerca de 20°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 105°C ou 120°C. Em algumas realizações, a etapa de reação da composição na presença de um álcool e uma base é realizada durante um período de cerca de 2 horas a cerca de 36 horas, de cerca de 3 horas a cerca de 36 horas, de cerca de 4 horas a cerca de 36 horas, de cerca de 5 horas a cerca de 36 horas, ou cerca de 6 horas a cerca de 36 horas. Em certas realizações, a etapa de

reação da composição na presença de um álcool e uma base é realizada por cerca de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 10; 12; 16; 20; 24; 28; 32 ou 36 horas

[00104] Em uma realização, a etapa de reação da composição de óleo, álcool e a base pode ser realizada pelo refluxo dos componentes para produzir os ésteres de ácidos graxos, tal como os ésteres de ácidos graxos poliinsaturados. Em realizações adicionais, a etapa de reagir a composição do óleo pode ser realizada a uma temperatura que não resulte no refluxo dos componentes da reação. Por exemplo, a realização da etapa de reação da composição de óleo sob pressões superiores a pressão atmosférica pode aumentar o ponto de ebulição dos solventes presentes na mistura de reação. Sob tais condições, a reação pode ocorrer em uma temperatura em que os solventes ferveriam em pressão atmosférica, mas não resultaria no refluxo dos componentes da reação. Em algumas realizações, a reação é conduzida a uma pressão de cerca de 5 a cerca de 20 libras por polegada quadrada (psi), cerca 7 até cerca de 15 psi, ou cerca de 9 até cerca de 12 psi. Em certas realizações, a reação é conduzida a uma pressão de 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 psi. Reações conduzidas sob pressão podem ser realizadas nas temperaturas de reação listadas acima. Em algumas realizações, as reações conduzidas sob pressão podem ser realizadas em cerca de pelo menos 70°C, 75°C, 80°C, 85°C ou 90°C. Em algumas realizações, as reações conduzidas sob pressão podem ser realizadas a 70°C, 75°C, 80°C, 85°C ou 90°C.

[00105] A mistura de reação compreende ésteres de ácidos graxos podem ainda ser adicionalmente processada para se obter os ésteres de ácidos graxos a partir da mistura. Por exemplo, a mistura pode ser arrefecida, diluída em água, e a solução aquosa extraída com um solvente tal como o hexano para produzir uma composição que compreende ésteres de ácidos graxos. Técnicas de lavagem e/ou reação de extração de misturas de óleo

bruto são conhecidos no estado da técnica.

[00106] Em algumas realizações da presente invenção, os microorganismos que produzem baixos níveis de PUFAs são usados para produzir óleos biológicos, especialmente para uso na produção de biodiesel. Este método poderia reduzir os custos de produção do biodiesel. Em algumas realizações da presente invenção, menos do que cerca de 50% dos ácidos graxos insaturados no óleo biológico são PUFAs. Para certas aplicações de biocombustível, o ácido graxo insaturados no óleo biológico contém preferencialmente menos de cerca de 40%, menos de cerca de 30%, menos de cerca de 20%, menos de cerca de 10%, ou menos de cerca de 5% de PUFAs. Em algumas realizações da presente invenção, o óleo biológico compreende menos de cerca de 50%, menos de cerca de 40%, menos de cerca de 30%, menos de cerca de 20%, menos de cerca de 10%, ou menos do que cerca de 5% por peso de PUFAs.

[00107] Os ésteres PUFA mais valiosos podem ser recuperados por destilação para produção de ésteres PUFA de alta potência que pode então ser vendido para reduzir o custo global de produção de um produto biodiesel.

[00108] Exemplos de sistemas de produção de lipídios modificados estão divulgados na publicação de patentes WO 06/031699, US 2006/0053515, US 2006/0107348 e WO 06/039449, cujos conteúdos são incorporados integralmente ao presente pela referência.

[00109] Em uma realização da presente invenção, ésteres de ácidos graxos são separados a partir da mistura de reação por destilação da composição para recuperar uma fração que compreende o éster de ácido graxo. Desta forma, uma fração alvo da mistura de reação, incluindo os ésteres de ácidos graxos de interesse pode ser separada da mistura de reação e ser recuperada.

[00110] Em certas realizações, a destilação é realizada sob vácuo. Sem

se vincular a teoria, a destilação sob vácuo permite que a destilação seja realizada em uma temperatura mais baixa do que na ausência de vácuo e, portanto, pode impedir a degradação de ésteres. Temperaturas de destilação típicas variam entre cerca de 120°C a cerca de 170°C. Em algumas realizações, a etapa de destilação é realizada a uma temperatura inferior a 180°C, inferior a cerca de 175°C, inferior a cerca de 170°C, inferior a cerca de 165°C, inferior a cerca de 160°C, inferior a cerca de 155°C, inferior a cerca de 150°C, inferior a cerca de 145°C, inferior a cerca de 140°C, inferior a cerca de 135°C, ou inferior a cerca de 130°C. Pressões típicas para o intervalo de destilação à vácuo é de cerca de 0,1 mmHg a cerca de 10 mmHg. Em algumas realizações, a pressão para a destilação a vácuo é de pelo menos cerca de 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 ou 4 mm Hg. Em algumas realizações, a pressão para a destilação a vácuo é de cerca de 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 ou 4 mmHg.

[00111] Em algumas realizações da presente invenção, os ésteres de ácidos graxos produzidos através da transesterificação dos óleos biológicos são adicionalmente isolados pela adução de uréia. A uréia pode ser dissolvida em um meio que inclui os ésteres de ácidos graxos para formar um meio composto por ésteres de ácidos graxos e uréia dissolvida. Este meio é, então, resfriado ou concentrado para formar um precipitado que compreende uréia e pelo menos uma porção de ésteres de ácidos graxos saturados, e uma fração líquida que compreende pelo menos a maior parte dos ésteres de ácidos graxos poliinsaturados. A fração precipitada e líquida pode então ser separada para isolar os ésteres de ácidos graxos saturados ou poliinsaturados. Em algumas realizações da presente invenção, o meio que compreende ésteres de ácidos graxos e uréia dissolvida é resfriado a uma temperatura de cerca de 20°C a -50°C, de cerca de 10°C a -40°C, ou de cerca de 0°C a -30°C. A Patente US 6.395.778, cujo conteúdo é incorporado ao presente pela referência em sua totalidade, divulga métodos de transesterificação seguido

pela adução de uréia.

[00112] Além dos métodos de transesterificação descritos acima, outras técnicas de redução da viscosidade dos óleos biológicos da presente invenção também podem ser incorporados aos métodos da presente invenção para produzir biocombustíveis à base de lipídios. Estas técnicas incluem, mas não estão limitadas a, o uso de lipases, catálise do metanol supercrítico e o uso de sistemas de células inteiras que envolvem a superexpressão citoplasmática de lipases em uma célula hospedeira seguido da permeabilização do hospedeiro para permitir a catálise da transesterificação de triglicerídeos no citoplasma. As Patentes ou pedidos de patente publicados US 7226771, US 2004/0005604, WO 03/089620, WO 05/086900, US 2005/0108789, WO 05/032496, WO 05/108533, US 6982155, WO 06/009676, WO 06/133698, WO 06/037334, WO 07/076163, 07/056786 WO e WO 06/124818, o conteúdos dos quais estão incorporados ao presente pelas referências em sua totalidade, divulgam exemplos de processos para a conversão de lipídios em biodiesel.

[00113] *Thraustochytrids* em geral e especificamente o *Schizochytrium*, são semelhantes a muitas microalgas marinhas e estuarinas e muitos protistas de modo que eles acumulam certa quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) em seus lipídios celulares. Os baixos níveis de PUFAs podem ser úteis de modo que eles devem reduzir o ponto de gelificação do combustível tornando-o mais adequado para climas frios. Os consumidores potenciais que reclamam sobre os odores gerados pela queima de biodiesel contendo ácidos graxos poliinsaturados em motores ineficientes (que passam combustível parcialmente oxidado pelo escape), podem ser de algum modo compensados pelo fato de que o biodiesel de microalgas pode ser misturado com o diesel fóssil em proporções de 1 - 99% para minimizar este problema. Para garantir que 100% do biodiesel derivado do óleo de microalgas poderia ser queimado sem problemas significativos ao consumidor, a hidrogenação parcial ou total do

óleo, como é rotineiramente utilizado na fabricação de margarinas, pode ser usada. Em algumas realizações da presente invenção, a tecnologia de craqueamento (tal como métodos de craqueamento conhecidos na indústria de petróleo) pode ser usada para reduzir o comprimento da cadeia de ácidos graxos. Uma vez que o óleo biológico foi produzido em de acordo com os métodos da presente invenção, o craqueamento do óleo biológico pode ser realizado para produzir o biocombustível à base de lipídeos desejado. Para certos biocombustíveis baseados em lipídios em que uma variedade de hidrocarbonetos mais curtos são necessários, tal como para os biocombustíveis para a viação, altos níveis de PUFAs podem ser úteis para que a clivagem de PUFA em vários locais possa ocorrer para produzir os diversos hidrocarbonetos.

[00114] As composições de biocombustíveis à base de lipídios da presente invenção são produzidas a baixo custo e são substitutos eficientes para o diesel de petróleo ou combustível para a aviação. Em algumas realizações da presente invenção, a composição de biocombustível à base de lipídios compreende cerca de 1% a cerca de 75 % em peso de alquil ésteres de PUFAs de cadeia longa com 20 ou mais carbonos. Em algumas realizações da presente invenção, a composição de biocombustível compreende cerca de 2% a cerca de 50% em peso, cerca de 4% a cerca de 25%, cerca de 5% a cerca de 10% em peso de alquil ésteres de PUFAs de cadeia longa com 20 ou mais carbonos.

[00115] Em algumas realizações da presente invenção, as composições de biocombustível à base de lipídeos (100% de biocombustível à base de lipídeos, não misturado com o diesel de petróleo ou querosene de aviação) têm uma temperatura de fusão de cerca de 30°C a cerca de -60°C, de cerca de 30°C a cerca de -50°C, de cerca de 25°C a cerca de -50°C, de cerca de 20°C a cerca de -30°C, de cerca de 20°C a cerca de -20°C, de cerca de 20°C a cerca

de -10°C, de cerca de 10°C a cerca de -10°C, ou de cerca de 0°C a cerca de -10°C. Em outras realizações da presente invenção, as composições de biodiesel libera cerca de 30 a cerca de 45 megajoules por litro, cerca de 35 a cerca de 40 megajoules por litro, ou de cerca de 38 a cerca de 40 megajoules por litro. Diversas formas de biodiesel são discutidas, por exemplo, nas Patentes ou pedidos de patentes publicados WO 07/061903, US 7172635, EP 1 227 143, WO 02/38709, WO 02/38707 e US 2007/0113467 cujos conteúdos são incorporados integralmente ao presente pela referência.

[00116] A presente invenção também fornece uma fabricação escalonável de biocombustível à base de lipídio que pode ser co-localizada com uma instalação de produção de etanol (tal como uma instalação de etanol celulósico). Exemplos de sistemas de algas relacionadas com a produção combustíveis não baseados em lipídios (como o etanol) são divulgados na patente ou pedido de patente publicada US 7135308 e WO 02/05932, cujos conteúdos são incorporados integralmente ao presente pela referência.

[00117] Em algumas realizações da presente invenção, o tratamento de matérias-primas seriam semelhantes ou idênticas, tanto para o etanol celulósico quanto para fermentações de biocombustíveis celulósicos baseados em lipídeos. Por exemplo, depois de uma fermentação de biodiesel celulósico, o óleo pode ser extraído e transesterificado (tanto de maneira simultânea quanto de maneira sequencial) para produzir biodiesel. O álcool utilizado na transesterificação poderia ser proveniente de um processo de produção de etanol (como um processo de produção de etanol celulósico), e os resíduos de glicerol a partir da transesterificação do biodiesel poderiam ser usados como uma fonte de carbono para complementar o processo de fermentação do etanol (ou para o processo do biodiesel em si, uma vez que organismos como o *Schizochytrium* metabolizam prontamente o glicerol). Em algumas realizações da presente invenção, os microorganismos utilizados na invenção são capazes

de utilizar o glicerol como fonte de carbono. Resíduos nitrogenados (como, por exemplo, biomassa de levedura) podem também servir como fontes de nitrogênio nas fermentações para biodiesel (mais *Thraustochytrids* poderiam utilizar extrato de levedura como fonte de nitrogênio). Resíduos, tal como biomassa de microorganismos deslipidada, podem ser reciclados para uso em uma fermentação subsequente, queimados por calor ou eletricidade, ou usados como fertilizante para a cultura fornecida com a matéria-prima celulósica. O biodiesel resultante ou gases residuais podem ser usados como combustível biodiesel ou nas instalações de produção de etanol, tornando-as independentes de energia. Além disso, as bombas na instalação poderiam ser impulsionadas pela recuperação do ar expelido.

[00118] Em algumas realizações da presente invenção, o método de produção de biocombustíveis à base de lipídios compreende a cultura de microorganismos utilizando nutrientes compreendendo meios reciclados para produzir um óleo biológico. O meio reciclado inclui, mas não está limitado a, biomassa deslipidada, biomassa hidrolisada, biomassa parcialmente hidrolisada, metais, sais, aminoácidos, carboidratos extracelulares, glicerol, biomassa de levedura ou combinações destes, todos os quais foram reciclados a partir de uma fermentação executada anteriormente ou a partir de outro processo. Por exemplo, a biomassa de levedura residual e a biomassa residual deslipidada de *Stramenopile* hidrolisada podem ser recicladas para o pré-tratamento a vapor, explosão de fibra de amônia, etapa de separação, ou para a hidrólise enzimática, etapas de separação e evaporação como mostrado na Figura 1. A biomassa parcialmente hidrolisada pode ser reciclada de volta juntamente com o meio nestas etapas para uma hidrólise adicional. O uso de meios reciclados pode ser empregado para a produção de óleos biológicos com alto ou baixo teor de ácidos graxos poliinsaturados, dependendo dos requisitos para uma aplicação específica.

[00119] A tecnologia à base de celulose (carbono de baixo custo) da presente invenção pode ser usada para reduzir os custos da produção de um composto que pode ser produzido pela fermentação de leveduras, ou microorganismos do reino *Stramenopile* (tal como *Thraustochytrids*), incluindo microorganismos geneticamente modificados. Exemplos de compostos que podem ser produzidos utilizando os métodos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, PUFAs, ésteres de PUFAs, proteínas (incluindo enzimas e proteínas terapêuticas), oxilipinas, carotenóides e lipídios.

[00120] Em algumas realizações, os métodos da presente invenção podem ser usados para produzir composições que contêm uma alta porcentagem de PUFAs ou ésteres de PUFAs. Por exemplo, tais composições podem conter de cerca de 50% em peso a cerca de 100% em peso de PUFAs ou um éster de PUFAs, e em outras realizações, a composição pode compreender pelo menos cerca de 50% em peso, pelo menos cerca de 55% em peso, pelo menos cerca de 60% em peso, pelo menos cerca de 65% em peso, pelo menos cerca de 70% em peso, pelo menos cerca de 75% em peso, pelo menos cerca de 80% em peso, pelo menos cerca de 85% em peso, pelo menos cerca de 90% em peso, pelo menos cerca de 95% em peso, pelo menos cerca de 99% em peso de PUFAs ou ésteres de PUFAs.

[00121] Composições que compreendem PUFAs ou ésteres de PUFAs da presente invenção podem ser usados em produtos farmacêuticos. Em algumas realizações, os produtos farmacêuticos podem conter PUFAs ou ésteres de PUFAs sem um agente farmacologicamente ativo adicional. Em outras realizações, o produto farmacêutico pode compreender um agente farmacologicamente ativo. Exemplos de agentes farmacologicamente ativos incluem estatinas, anti-hipertensivos, agentes anti-diabéticos, agentes anti-demência, antidepressivos, agentes anti-obesidade, inibidores de apetite e agentes para reforçar a memória e/ou função cognitiva. Os produtos

farmacêuticos podem ainda dispor de qualquer excipiente farmacêuticamente aceitável, veículos, ligantes ou outros componentes da formulação conhecidos no estado da técnica.

[00122] PUFAs ou ésteres de PUFAs produzidos pelos métodos da presente invenção são adequados para uso como agentes terapêuticos e experimentais. Uma realização da presente invenção compreende a produção de PUFAs ou ésteres de PUFAs no tratamento de recém-nascidos deficientes de PUFAs. Os PUFAs ou ésteres de PUFAs podem ser incluídos em uma formulação parenteral, que pode ser administrada a um infante através de vias parenterais para fortalecer suprimento do bebê de um PUFA. As vias de administração parenterais preferidas incluem, mas não estão limitadas a, via subcutânea, intradérmica, endovenosa, intramuscular e intraperitônio. Uma formulação parenteral pode incluir PUFAs ou ésteres de PUFAs da presente invenção e um veículo adequado para a entrega parenteral. Conforme utilizado na presente invenção, um “veículo” se refere a qualquer substância adequada como veículo para a entrega de uma molécula ou composição a um sítio de ação *in vivo* adequado. Exemplos de transportadores incluem, mas não estão limitados a, água, salina fosfato tamponada, solução de Ringer, dextrose, soluções contendo soro, solução de Hank e outras soluções aquosas equilibradas fisiologicamente. Veículos adequados incluem também veículos à base de óleo, soluções não-aquosas, suspensões e emulsões. Exemplos incluem propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais como o azeite, ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila, óleo de rícino polietoxilado (*cremaphor*), e outros conhecidos no estado da técnica. Protocolos aceitáveis para administrar PUFAs ou ésteres de PUFAs de uma forma eficaz incluem o tamanho das dosagens individuais, o número de doses, a frequência de administração da dose e o modo de administração. A determinação de tais protocolos pode ser realizada pelos técnicos hábeis no assunto, dependendo

de uma série de variáveis, incluindo o peso do infante e o grau de deficiência de PUFA. Outra realização da presente invenção compreende a produção de PUFAs ou ésteres de PUFAs no tratamento de adultos, especificamente de mães grávidas. Protocolos aceitáveis para a administração de PUFAs ou ésteres de PUFAs em adultos inclui técnicas de alimentação parenteral ou encapsulamento de PUFAs ou ésteres de PUFAs da presente invenção em uma cápsula, tal como a cápsula de gelatina (ou seja, digestível), para administração oral e/ ou na formulação de uma dieta líquida. A formulação de dieta líquida pode compreender uma composição líquida contendo nutrientes adequados para suplementar uma dieta ou de nutrientes suficientes na forma de uma dieta completa.

[00123] PUFAs ou ésteres de PUFAs produzidos pelos métodos da presente invenção também podem ser usados para tratar pacientes (por exemplo, humanos ou animais) com altos níveis de triglicérides, incluindo indivíduos com trigliceridemia. Por exemplo, indivíduos com níveis de triglicérides igual ou superior a 500 mg/dL podem se beneficiar pelo tratamento com os PUFAs ou ésteres de PUFAs da presente invenção. Em algumas realizações, PUFAs individuais ou ésteres de PUFAs podem ser administradas a um indivíduo para tratar níveis elevados de triglicérides. Em certas realizações, o PUFA ou éster de PUFA pode ser DHA ou ARA. Em algumas realizações, combinações de PUFAs ou ésteres de PUFAs podem ser administradas a um indivíduo para tratar níveis elevados de triglicérides. Em certas realizações, a combinação de PUFAs ou ésteres de PUFAs podem compreender PUFAs ômega-3 e ômega-6 como DHA e DPA n-6. Em algumas realizações, as PUFAs ou ésteres de PUFAs podem conter cerca de 90% da composição administrada ao paciente. Os PUFAs ou ésteres de PUFAs podem ser administrados com outros componentes e excipientes, tais como os veículos descritos acima. Os PUFAs ou ésteres de PUFAs podem também ser

usados para tratar pacientes com doenças que podem estar associadas com altos níveis de triglicérides como, por exemplo, doença cardiovascular ou hipertensão.

[00124] Os ésteres de PUFAs produzidos pelos métodos da presente invenção podem ser usados para produzir sais de PUFA. Em algumas realizações, sais de PUFAs podem ser produzidos pela reação de ésteres de PUFA da presente invenção na presença de uma base de metal alcalino, tal como hidróxido de um metal alcalino (por exemplo, hidróxido de potássio). Os sais de PUFA formados a partir de ésteres de PUFA da presente invenção podem ser usados em uma variedade de aplicações, como em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos. Em algumas realizações, os sais de PUFA produzidos a partir de ésteres de PUFA da presente invenção são solúveis em água e podem ser usados diretamente nos alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos.

[00125] As PUFAs ou ésteres de PUFAs produzidos pelos métodos da presente invenção podem ser usados em qualquer material de origem animal, matérias particularmente alimentos para consumo humano, para criar um produto alimentar possuindo concentrações aumentadas de PUFAs. A quantidade de ácidos graxos naturalmente nos produtos alimentícios varia de um produto alimentar para outro. Um produto alimentar da presente invenção pode ter uma quantidade normal de PUFA ou uma quantidade modificada de PUFA. No primeiro caso, uma parte dos lipídios que ocorrem naturalmente pode ser substituída por PUFAs ou ésteres de PUFAs da presente invenção. No último caso, uma parte dos lipídios que ocorrem naturalmente pode ser suplementada com PUFAs ou ésteres de PUFAs da presente invenção.

[00126] PUFAs ou ésteres de PUFAs podem ser adicionados aos alimentos para lactentes, na forma de fórmulas infantis e alimentos para bebês. De acordo com a presente invenção, um infante refere-se a bebês e crianças

com menos de dois anos de idade, incluindo, especificamente, os bebês prematuros. Certos PUFAs são componentes particularmente importantes da fórmula infantil e de alimentos para bebês por causa do rápido crescimento das crianças (pois dobram ou triplicam de peso durante o primeiro ano de vida). Uma quantidade eficaz de PUFA ou ésteres de PUFA para suplementar a fórmula infantil é uma quantidade que se aproxima da concentração de PUFAs no leite materno de humanos. Quantidades preferidas de PUFAs ou ésteres de PUFAs para serem adicionadas à fórmula infantil ou alimento para bebês varia entre cerca de 0,1 a cerca de 1,0% do total de ácidos graxos, preferencialmente cerca de 0,1 a cerca de 0,6% do total de ácidos graxos, e ainda mais preferencialmente, cerca de 0,4% do total de ácidos graxos.

[00127] Outro aspecto da presente invenção inclui um produto alimentício que compreende um material alimentício combinado com PUFAs ou ésteres de PUFAs da presente invenção. PUFAs ou ésteres de PUFAs podem ser adicionados a um material alimentício para criar um produto alimentício que possui concentrações aumentadas de PUFAs. Conforme utilizado na presente invenção, o termo “material alimentício” refere-se a qualquer tipo de alimento consumido por seres humanos ou animais não-humanos. Também está dentro do escopo da presente invenção um método para fazer um produto alimentício que compreende um produto com a adição de PUFAs ou ésteres de PUFAs produzidos pelos métodos da presente invenção a um material alimentício.

[00128] Um material alimentício adequado útil para a formação de um produto alimentício da presente invenção inclui alimentos de animais. O termo “animal” significa qualquer organismo pertencente ao reino *Animalia* e inclui, sem se limitar, aos primatas (por exemplo, seres humanos e macacos), gado e animais domésticos. O termo “produto alimentício” inclui qualquer produto a ser consumido por tais animais. Materiais alimentícios preferidos para serem consumidos por seres humanos incluem fórmulas para infantes e alimentos

para bebês. Materiais alimentícios preferidos para serem consumidos por animais domésticos incluem alimentos para cães.

[00129] PUFAs ou ésteres de PUFAs produzidos por métodos da presente invenção podem ser adicionados a uma grande variedade de produtos como alimentos assados, suplementos vitamínicos, suplementos dietéticos, bebidas em pó, e etc, em várias etapas de produção. Numerosos produtos alimentícios em pó prontos ou semi-prontos podem ser produzidos utilizando as composições da presente invenção.

[00130] Uma lista parcial de produtos alimentares compreendem os produtos da presente invenção que inclui; pastas, massas, alimentos cozidos, incluindo, por exemplo, itens como bolos, *cheesecakes*, tortas, biscoitos, bolachas, barras, pães, rolos, *biscuits*, *muffins*, pasteis, *scones*, e croutons; produtos alimentares líquidos, por exemplo, bebidas, bebidas energéticas, fórmulas infantis, refeições líquidas, sucos de frutas, xaropes multivitamínicos, substitutos de refeições, alimentos medicinais, e xaropes; produtos alimentares semi-sólidos, como a comida para bebê, iogurte, queijos, cereais, misturas de panqueca; barras de alimentos, incluindo barras energéticas; carnes processadas, sorvetes, sobremesas congeladas, iogurtes congelados; misturas para *waffle*, molhos para salada e misturas substitutas de ovos. Também estão incluídos os alimentos assados, como biscoitos, bolachas, produtos doces, bolos tipo lanche, tortas, barras de granola/lanche, pasteis e torradas; *snacks* salgados, como batatas fritas, salgadinhos de milho, *tortilla chips*, *snacks* extrudados, pipocas, biscoitos, batatas fritas e nozes; lanches especiais, tais como *dips*, lanches de frutas secas, petiscos de carne, pele de porco, barras de alimentos saudáveis de arroz/milho e lanches de confeitaria tal como doces.

[00131] Outra realização de produto da presente invenção é um alimento medicinal. Um alimento medicinal inclui um alimento que é elaborado para ser consumido ou administrado externamente sob a supervisão de um médico e

que se destina à gestão dietética específica de uma doença ou condição para o qual as necessidades nutricionais distintas, com base em princípios científicos reconhecidos, são estabelecidas pela avaliação médica.

[00132] A presente invenção, quando divulgada em termos de métodos específicos, produtos e organismos pretende englobar todos esses métodos, produtos e organismos obtidos e úteis de acordo com os ensinamentos divulgados no presente relatório descritivo, incluindo todas as substituições, modificações e otimizações que poderiam estar disponíveis para os técnicos hábeis no assunto. Os exemplos seguintes a seguir e os resultados dos testes são fornecidos para fins ilustrativos e não pretendem limitar o escopo de aplicação da presente invenção.

### **EXEMPLOS**

#### **EXEMPLO 1**

[00133] Usando fermentadores de 2-litros, em condições típicas de fermentação, culturas de um *Schizochytrium* ou *Thraustochytrium* do tipo selvagem seriam cultivados utilizando uma fonte Sacarificada de celulose. Cada fermentador seria agrupado com uma meio contém carbono (celulose sacarificada), nitrogênio, fósforo, sais, traço de metais e vitaminas. Cada fermentador seria inoculado com uma cultura de semente típica, em seguida, cultivadas por 72 - 120 horas, e tanto alimentadas com carbono (celulose sacarificada) quanto com nitrogênio durante o cultivo. A alimentação de nitrogênio seria alimentada e consumida apenas durante a fase de crescimento, enquanto que a de carbono (celulose sacarificada) seria alimentada e consumida durante toda a fermentação. Após 72 - 120 horas, cada fermentador seria coletado e autolisado ou hidrolisado. O material hidrolisado seria separado em frações de óleo e biomassa. O óleo seria então transesterificado e separado do glicerol. O mono alquil éster poderia ser lavado em água para produzir um produto acabado.

Condições de controle típicas da fermentação:

Temperatura	20 – 40 graus Celsius
pH:	3.0-10.0
Agitação:	100-400cps
Fluxo de ar	0,25 – 3,0 w/m
Celulose sacarifica:	5-35 g/L (Concentração no tanque)
Inóculo:	1% - 50%

### **EXEMPLO 2**

[00134] Usando fermentadores de 10-litros, sob condições típicas de fermentação, uma cultura de um *Schizochytrium* ou *Thraustochytrium* transgênico seria cultivada em uma fonte de celulose liquefeita. O organismo deve produzir as enzimas necessárias para, simultaneamente sacarificar a celulose e metabolizar a glicose, xilose, hemicelulose e lignina. Cada fermentador seria agrupado com um meio contém carbono (celulose liquefeita), nitrogênio, fósforo, sais, traço de metais e vitaminas. Cada fermentador seria inoculado com uma cultura de semente típica, em seguida, cultivadas por 72 - 120 horas, e alimentadas tanto com carbono (celulose liquefeita) quanto com nitrogênio durante o cultivo. A alimentação de nitrogênio seria alimentada e consumida apenas durante a fase de crescimento, enquanto que a de carbono (celulose liquefeita) seria alimentada e consumida durante toda a fermentação. Após 72 - 120 horas, cada fermentador seria coletado e autolisado ou hidrolisado. O material hidrolisado seria separado em frações de óleo e biomassa. O óleo seria então transesterificado e separado do glicerol. O mono alquil éster poderia ser lavado em água para produzir um produto acabado.

Condições típicas da fermentação:

<b>Temperatura</b>	20 – 40 graus Celsius
--------------------	-----------------------

<b>pH:</b>	3.0-10.0
<b>Agitação:</b>	100-400cps
<b>Fluxo de ar</b>	0,25 – 3,0 wm
<b>Celulose liquefeita:</b>	5-35 g/L (Concentração no tanque)
<b>Inóculo:</b>	1% - 50%

### **EXEMPLO 3**

[00135] O *Schizochytrium* ou *Thraustochytrium* transgênico do Exemplo 2 será desenvolvido utilizando um sistema de transformação de saída (tal como aquela divulgada no pedido de patente publicado WO 2002/083869 A2) para expressar os genes que codificam apropriadas e conhecidas celulases, hemicelulases, ligninases, transportadores sacarídeos, epimerases e isomerases de sacarídeos. Alternativamente, as celulases previamente não caracterizadas, hemicelulases, ligninases, transportadores de sacarídeos, epimerases e isomerases de sacarídeos poderiam ser isoladas a partir de bases de dados do genoma ou através de estratégias padrões de descoberta do gene com organismos não caracterizados ou menos caracterizados, incluindo PCR com *primers* degenerados com base em regiões conservadas de genes homólogos ou sequenciamento de massa e procura de etiquetas de sequência expressa (ESTs), ou sequências do genoma, ou outras técnicas. A expressão gênica e atividades do produto gênico poderiam ser validados usando técnicas padrão, como eletroforese em gel, *Northern blot* e *Western blot*, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e ensaios de conversão de substrato.

### **EXEMPLO 4**

[00136] Usando fermentadores de 2 litros, em condições típicas de fermentação, duas culturas de *Schizochytrium* do tipo selvagem (ATCC 20888) foram cultivadas para comparar os perfis de ácidos graxos e as taxas de

produção de lipídios sob condições estéreis e não-estéreis. Cada fermentador foi preparado com uma meio contém carbono, nitrogênio, fósforo, sais, traço de metais e vitaminas. O fermentador estéril foi autoclavado por 120 minutos e todos os componentes do meio foram ou esterilizado no fermentador ou adicionado como soluções estéreis após a autoclavagem. O fermentador não-estéril foi preparado com água da torneira e todos os ingredientes foram adicionados ao fermentador sem esterilização antes da inoculação. Cada fermentador foi inoculado com uma cultura de semente típica, em seguida, cultivado por 50 horas, e alimentados tanto com carbono quanto com nitrogênio durante o cultivo. A alimentação de nitrogênio foi alimentada e consumida apenas durante a fase de crescimento, enquanto que a de carbono foi alimentada e consumida durante toda a fermentação. Após 50 horas, cada fermentador foi amostrado, centrifugado, liofilizado, convertido em ésteres metílicos de ácidos graxos, e analisados por cromatografia gasosa.

Condições típicas da fermentação:

<b>Temperatura</b>	28 – 30 graus Celsius
<b>pH:</b>	5,0 – 7,5
<b>Agitação:</b>	100-400cps
<b>Fluxo de ar</b>	0,25 – 2,0 w/m
<b>Glicose:</b>	5 - 55 g/L (Concentração)
<b>Inóculo:</b>	1% - 30%

Os resultados foram os seguintes:

<b>Condição</b>	<b>Estéril</b>	<b>Não-estéril</b>
Cepa	ATCC 20888	ATCC 20888
Hora de registro	50	50
Amostra	BN25 8.08,14	BN26 8.08,14

<b>Condição</b>	<b>Estéril</b>	<b>Não-estéril</b>
% 12:0	0,21	0,12
% 13:0	0,16	0,16
% 14:0	9,73	6,14
% 15:1	0,59	0,79
% 16:0	39,93	36,26
% 16:1	0,13	0,07
% 17:0	0,17	0,28
% 18:0	1,13	1,16
% 18:1 n-9	0,13	0,08
% 18:1 n-7	0,10	0,00
% 18:3 n-6	0,10	0,12
% 18:3 n-3	0,04	0,07
% 18:4 n-3	0,12	0,13
% 20:0	0,10	0,10
% 20:3 n-6	0,27	0,33
% 20:4 ARA	0,37	0,32
% 20:5 EPA	0,45	0,56
% 22:5 n-6	12,61	14,52
% 22:6 DHA	32,67	37,43
% Gordura	40,92	35,79
% Desconhecido	0,98	1,10
% saturados	51,44	44,23
% monosaturados	0,81	0,87
% poliinsaturados	46,64	53,48

Figuras 3 e 4 exibem gráficos dos resultados do experimento.

**EXEMPLO 5**

[00137] Usando um fermentador de 5 litros, sob condições de fermentação de baixo custo o *Schizochytrium* do tipo selvagem (ATCC 20888) foi cultivado para avaliar o potencial de produção da biomassa algal heterotrófica usando condições não estéreis de baixo custo. O não-fermentador não estéril consistia de um tanque de aço carbono, revestido com uma membrana de polipropileno, um tubo borrifador, um tubo de escape, e um tubo de adição. O fermentador não-estéril foi preparado com água da torneira e um meio contendo carbono, nitrogênio, fósforo, sais, traço de metais e vitaminas. Os ingredientes foram adicionados ao fermentador sem esterilização antes da inoculação. O fermentador foi inoculado com uma cultura de 50 mL de um frasco de 250 mL. O fermentador foi cultivado por 6 dias, nada foi adicionado ao fermentador durante o cultivo (pós-inoculação). Após 6 dias, cada fermentador foi amostrado, liofilizado, convertido em ésteres metílicos de ácidos graxos, e analisados por cromatografia gasosa.

Condições típicas da fermentação:

<b>Temperatura</b>	28 – 30 graus Celsius
<b>pH:</b>	Sem controle
<b>Agitação:</b>	Não
<b>Fluxo de ar</b>	2,0 – 4,0 w/m
<b>Glicose:</b>	80 g/L (concentração inicial, sem alimentação adicional)
<b>Inóculo:</b>	1%

Meio de batelada não estéril

<b>Ingredientes</b>	<b>Concentração Final</b>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8g/L
KCl	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 g/L

<b>Ingredientes</b>	<b>Concentração Final</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 g/L
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	51,5 mg/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3,1 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,1 mg/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,04 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04 mg/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,07 mg/L
NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,07 mg/L
Tiamina	9,75 mg/L
Vitamina B12	0,16 mg/L
Ca <sub>1/2</sub> -pantotenato	3,33 mg/L
Glucose	80 g/L

Os resultados foram os seguintes:

% PUFA	5,75
% monoinsaturados	55,18
% saturados	37,19
g/L óleo	4,64

### **EXEMPLO 6**

[00138] Um sistema de fermentação de duas etapas poderia ser usado na fermentação heterotrófica de um microorganismo. A primeira etapa (etapa de semeadura) visaria o acúmulo de biomassa e a segunda etapa (etapa de produção de lipídios) visaria o acúmulo de lipídios. Um exemplo do sistema de fermentação é descrito abaixo.

[00139] O sistema de fermentação descrito abaixo inclui um tanque de semeadura contínua e tanque de produção de vários lipídios sendo executado

no modo de batelada alimentado. O tanque de sementeira tem um volume de trabalho dos xx galões, um oitavo do tanque de produção de lipídios (xxx galões), com base nos seguintes pressupostos:

- (1) 6 horas de tempo de duplicação celular,
- (2) 24 horas de preenchimento para cada etapa descontínua de produção de lipídios
- (3) o volume inicial (após o enchimento) de cada produção de lipídios descontínua sendo 1/2 do volume da coleta

#### **ETAPA DE SEMEADURA CONTÍNUA**

[00140] Após a inoculação/crescimento inicial para atingir o estado estacionário, o tanque de sementeira receberá alimentação contínua de nutrientes estéreis, a uma taxa constante (xx GPM, -1/48 do volume de coleta por hora). Caldo será retirado do tanque e transferido para um tanque da etapa de produção de lipídios na mesma taxa que a alimentação de nutrientes. Após o tanque de produção atingir o volume desejado de partida (~ 1/2 do volume da coleta após ~ 24-horas de enchimento), o tanque de sementeira será, então, conectado ao próximo tanque de produção de lipídios disponível.

[00141] A alimentação com nutrientes incluirá uma fonte de carbono (matéria-prima celulósica e/ou açúcares simples), uma fonte de nitrogênio (por exemplo, NH<sub>3</sub>), sais, vitaminas e oligoelementos e traços de metais em concentrações para manter o crescimento adequado (e mais tarde para manter a produção de lipídios ideal). A biomassa deslipidada reciclada e glicerol pode ser usado como parte dos nutrientes para reduzir o custo das matérias-primas. Em estado estacionário, a concentração de biomassa, chegará provavelmente a pelo menos cerca de 50-100 g/L.

[00142] O fluxo de ar será fornecido para fornecer o oxigênio suficiente para o crescimento celular. A fluxo de ar necessário pode estar na faixa de ~ 0,5 - 1,0 vvm para alcançar a TAO (taxa de absorção de oxigênio) de ~ 50 -

150 mmol/L/hr. A geração de calor metabólica significativa é esperada para o processo e a remoção de calor suficiente será necessária para manter a temperatura do processo (por exemplo, -25 -35°C). A relação de 0,113 Kcal/mmols de captação de O<sub>2</sub> é comumente usada para estimar a produção de calor metabólico por micro-organismos e uma geração de calor estimada de ~ 6-17 Kcal/L/h pode ser produzida. Parte do calor pode ser removido pelo fluxo de ar, mas a capacidade de remoção significativa de calor será ainda necessária para manter a temperatura alvo. O controle de pH por um ácido (por exemplo, ácido sulfúrico) e/ou uma base (soda cáustica) pode ser necessária manter o pH alvo para um crescimento ótimo. Devido à natureza da etapa de semeadura, as condições de processos e o meio, muito provavelmente, favorecem o crescimento de contaminantes e, portanto, o projeto de sistema com baixo risco de contaminação será altamente desejável. O processo de duas etapas pode ser realizado em fermentadores não-estéreis através da seleção de condições que são desfavoráveis para os contaminantes. Outra opção é executar a etapa de semeadura contínua asépticamente e a etapa de produção de lipídios (que pode estar sob uma limitação de nutrientes, como a limitação de nitrogênio) em condições não estéreis.

#### **ETAPA DE PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS (BATELADA ALIMENTADA)**

[00143] O tanque da etapa de produção de lipídios será executado como um processo de batelada alimentado. A maioria dos nutrientes serão recebidos a partir da etapa de semeadura (durante as 24 horas de preenchimento) e a fonte de carbono será alimentada ao lote para manter uma concentração de açúcar alvo durante a execução.

[00144] Cada batelada de produção de lipídios terá um tempo de ciclo total de 120 horas, 24 horas para o preenchimento (que recebe o caldo do tanque de semeadura), 72 horas para a produção de lipídios e 24 horas para a coleta e rotação. Portanto, cada tanque de semeadura deve ser capaz de fornecer

inóculo para cinco tanques da etapa de produção de lipídios. Como mencionado acima, a taxa de transferência da sementeira deverá estar entre ~ xxx GMP (1/48 pf coletado do volume por hora). Após as 24 horas de preenchimento, o tanque de produção deve ter em torno de 1/2 do volume da coleta alvo. A fonte de carbono, tais como matéria-prima celulósica (na concentração de ~70% de açúcar), será adicionada para manter uma concentração de açúcar alvo na maior parte do tempo de execução. Um agente anti-espuma será acrescentado conforme necessário, para minimizar a formação. Na coleta, pode ser alcançada uma concentração de biomassa de pelo menos cerca de 150 g/L ou pelo menos cerca de 300 g/L, e 60-80% de óleo na biomassa.

[00145] A estratégia de produção contínua ou semi-contínua pode ser utilizada para a produção de lipídios. No método contínuo, a biomassa é coletada na mesma taxa em que o tanque de produção de lipídeos é preenchido. Em um método semi-contínuo, a biomassa é coletada em intervalos regulares, com a quantidade de biomassa coletada dependente do ciclo de produção de lipídios. Por exemplo, em um ciclo de produção de lipídios de 72 horas, a metade do tanque de produção contendo a biomassa pode ser coletada a cada 36 horas, do mesmo modo, 25% da biomassa no tanque de produção podem ser coletados a cada 18 horas, 75% da biomassa no tanque de produção podem ser coletados a cada 54 horas, e assim por diante.

[00146] O oxigênio é necessário para manutenção de células e produção lipídica e um fluxo de ar será fornecido para fornecer transferência de oxigênio suficiente. A fluxo de ar necessário pode estar na faixa de ~ 0,5 - 1,0 vvm para atingir a TAO (taxa de absorção de oxigênio) de ~ -40 - 150 mmols/L/hr. Uma geração de calor metabólico significativo é esperado para o processo. A relação de 0,113 Kcal/mmol de captação de O<sub>2</sub> é comumente usada para estimar a produção de calor metabólico por micro-organismos e uma geração de calor estimada de ~ -6-17 Kcal/L/h pode ser produzida. Parte do calor pode

ser removido pelo fluxo de ar, mas a capacidade de remoção significativa de calor será ainda necessária para manter a temperatura alvo. O controle de pH por um ácido (por exemplo, ácido sulfúrico) e/ou uma base (soda cáustica) pode ser necessária manter o pH alvo para uma alta produtividade de lipídios.

#### **OUTRAS INFORMAÇÕES/CONSIDERAÇÕES**

[00147] O custo da fermentação pode ser reduzido se os resíduos da fermentação (tais como meios líquidos ou biomassa deslipidada) pudessem ser eficientemente reciclados.

[00148] O açúcar para a conversão da biomassa renderá provavelmente ~45-55% (em base molar) e o açúcar para a conversão em óleo terá um rendimento provável de ~30-40%.

[00149] Para minimizar o tempo de inatividade devido a potencial falha de equipamento ou anormalidades do lote, tanques adicionais de semeadura e de produção de lipídios devem ser considerados para o projeto da usina.

[00150] Os princípios, as realizações preferidas e modos de operação da presente invenção foram descritos no relatório descritivo acima. A invenção a qual se pretende proteger no presente documento não deve, entretanto, ser interpretada como limitada a formas específicas divulgadas, de modo que estas devem ser consideradas como ilustrativas e não restritivas. Variações e mudanças podem ser feitas pelos técnicos hábeis no assunto, sem se afastar do espírito da presente invenção. Consequentemente, o melhor modo de realizar a invenção deve ser considerado exemplarmente na natureza e não como uma limitação ao escopo e ao espírito da invenção, tal como estabelecido nas reivindicações anexas.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método para produzir um óleo biológico **caracterizado** por compreender pelo menos duas etapas:

(a) cultivar um microrganismo formador de óleo do gênero *Schizochytrium*, por fermentação heterotrófica em um fermentador que não foi esterilizado, em que a fermentação compreende dois estágios: (i) um primeiro estágio que tem como alvo o acúmulo de uma biomassa do microrganismo e (ii) um segundo estágio que visa o acúmulo de lipídios pelo microrganismo e em que 11% a 99% dos ácidos graxos insaturados no dito óleo biológico são ácidos graxos poliinsaturados; e

(b) isolar ou purificar o óleo biológico produzido na etapa (a), em que o isolamento compreende a extração do óleo da biomassa.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o cultivo do referido microrganismo formador de óleo do gênero *Schizochytrium* compreende alimentar o fermentador com celulose.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o fermentador é selecionado a partir do grupo que consiste em um fermentador reforçado com fibra, um fermentador composto de matriz de metal, um fermentador composto de matriz de cerâmica, um fermentador composto de termoplástico, um fermentador de metal, um fermentador de aço carbono forrado com epóxi, um fermentador de aço carbono forrados com plástico, um fermentador de plástico, um fermentador de fibra de vidro e um fermentador de concreto.4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a extração compreende extração física ou extração mecânica.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a extração compreende extração sem solvente.

6. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a celulose compreende celulose sacarificada, celulose hidrolisada e

suas combinações.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que não há limitação de nutrientes durante o estágio de acumulação de biomassa.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o estágio de acumulação de lipídios é realizado com limitação de nitrogênio com uma alimentação de carbono.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o estágio de acumulação de lipídios é realizado com limitação de nitrogênio com uma alimentação de carbono.

10. Método para produzir um óleo biológico **caracterizado** por compreender pelo menos duas etapas:

(a) cultivar um microrganismo formador de óleo do gênero *Thraustochytrium*, por fermentação heterotrófica em um fermentador que não foi esterilizado, em que a fermentação compreende dois estágios: (i) um primeiro estágio que visa o acúmulo de uma biomassa do microrganismo e (ii) um segundo estágio que visa o acúmulo de lipídios pelo microrganismo e em que 11% a 99% dos ácidos graxos insaturados no referido óleo biológico são ácidos graxos poliinsaturados; e

(b) isolar ou purificar o óleo biológico produzido na etapa (a), em que o isolamento compreende a extração do óleo da biomassa.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o cultivo do referido microrganismo formador de óleo do gênero *Thraustochytrium* compreende alimentar o fermentador com celulose.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o fermentador é selecionado a partir do grupo que consiste em um fermentador reforçado com fibra, um fermentador composto de matriz de metal, um fermentador composto de matriz de cerâmica, um fermentador composto

termoplástico, um fermentador de metal, um fermentador de aço carbono revestido de epóxi, um fermentador de aço carbono com linhas de plástico, um fermentador de plástico, um fermentador de fibra de vidro e um fermentador de concreto.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a extração compreende extração física ou extração mecânica.

14. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a extração compreende extração sem solvente.

15. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a celulose compreende celulose sacarificada, celulose hidrolisada e suas combinações.

16. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que não há limitação de nutrientes durante o estágio de acumulação de biomassa.

17. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o estágio de acumulação de lipídios é realizado com limitação de nitrogênio com uma alimentação de carbono.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que o estágio de acumulação de lipídios é realizado com limitação de nitrogênio com uma alimentação de carbono.

19. Método para produzir um óleo biológico **caracterizado** por compreender pelo menos duas etapas:

(a) cultivar um microrganismo formador de óleo do gênero *Ulkenia*, por fermentação heterotrófica em um fermentador que não foi esterilizado, em que a fermentação compreende dois estágios: (i) um primeiro estágio que visa o acúmulo de uma biomassa do microrganismo e (ii) um segundo estágio que visa o acúmulo de lipídios pelo microrganismo e em que 11% a 99% dos ácidos graxos insaturados no referido óleo biológico são ácidos graxos

poliinsaturados; e

(b) isolar ou purificar o óleo biológico produzido na etapa (a), em que o isolamento compreende a extração do óleo da biomassa.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de que o cultivo do referido microrganismo formador de óleo do gênero *Ulkenia* compreende alimentar o fermentador com celulose.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o fermentador é selecionado a partir do grupo que consiste em um fermentador reforçado com fibra, um fermentador composto de matriz de metal, um fermentador composto de matriz de cerâmica, um fermentador composto termoplástico, um fermentador de metal, um fermentador de aço carbono revestido de epóxi, um fermentador de aço carbono com linhas de plástico, um fermentador de plástico, um fermentador de fibra de vidro e um fermentador de concreto.

22. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que a extração compreende extração física ou extração mecânica.

23. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que a extração compreende extração sem solvente.

24. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que a celulose compreende celulose sacarificada, celulose hidrolisada e suas combinações.

25. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que não há limitação de nutrientes durante o estágio de acumulação de biomassa.

26. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o estágio de acumulação de lipídios é realizado com limitação de nitrogênio com uma alimentação de carbono.

27. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo

fato de que o estágio de acumulação de lipídios é realizado com limitação de nitrogênio com uma alimentação de carbono.

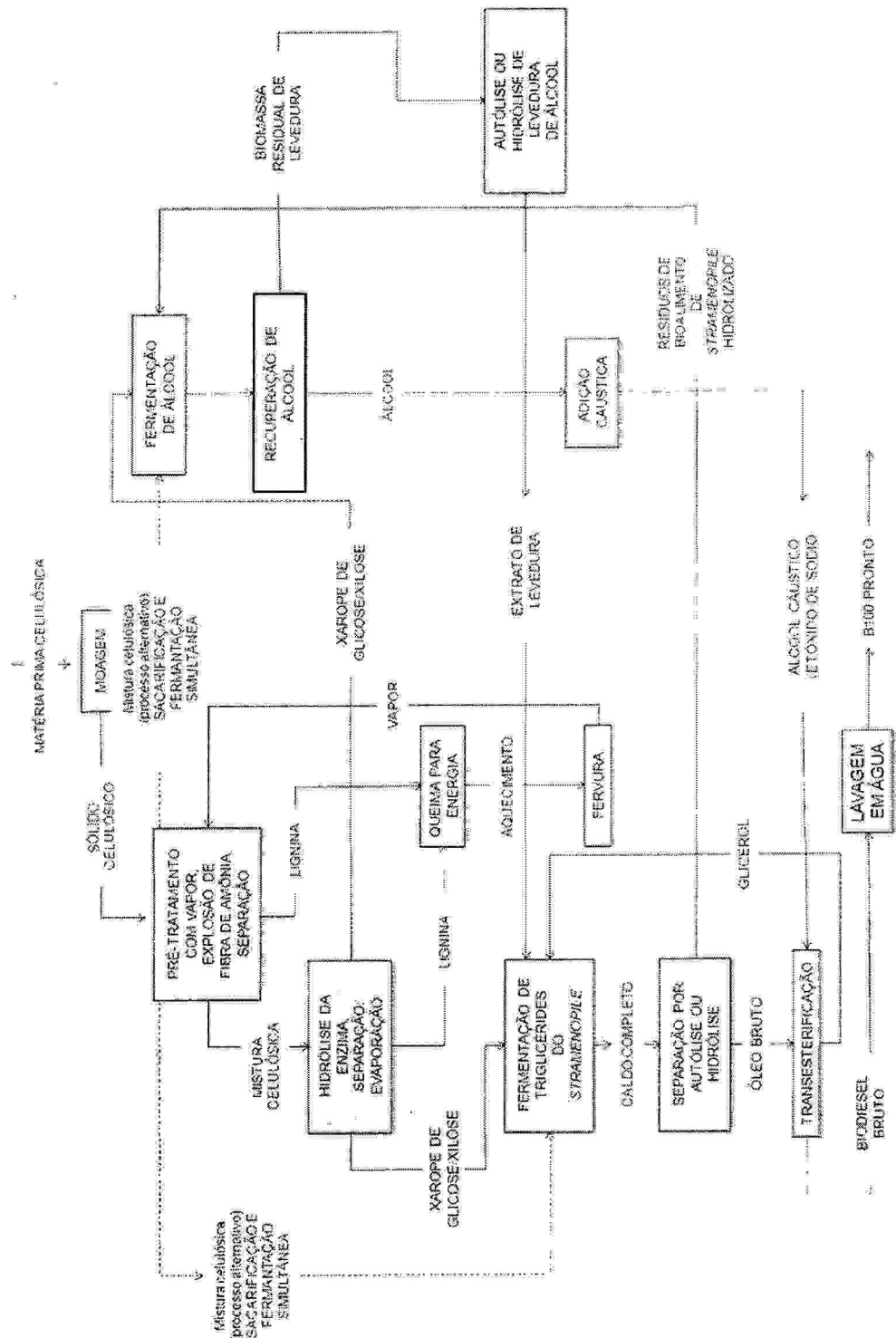


Fig.1

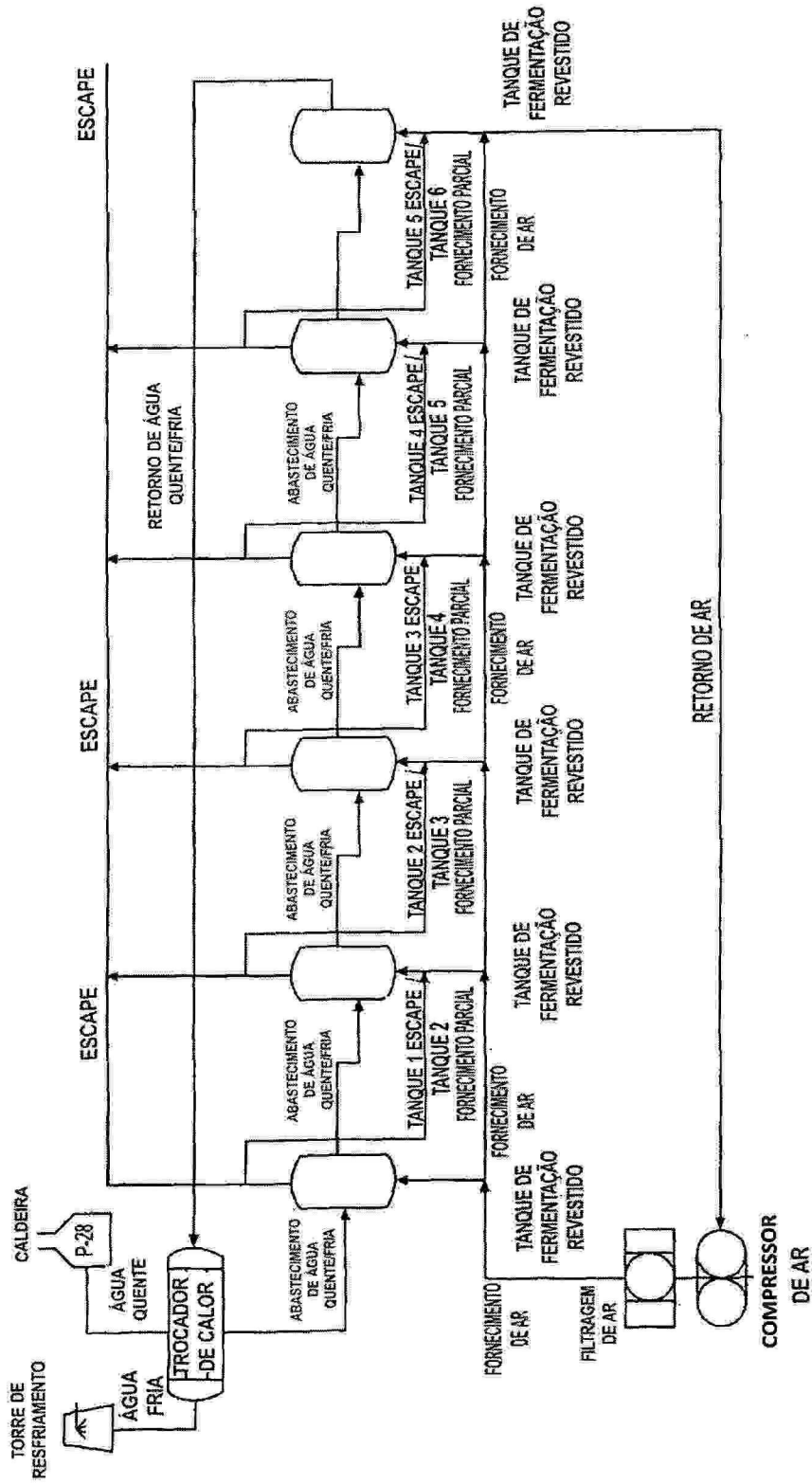


Fig.2

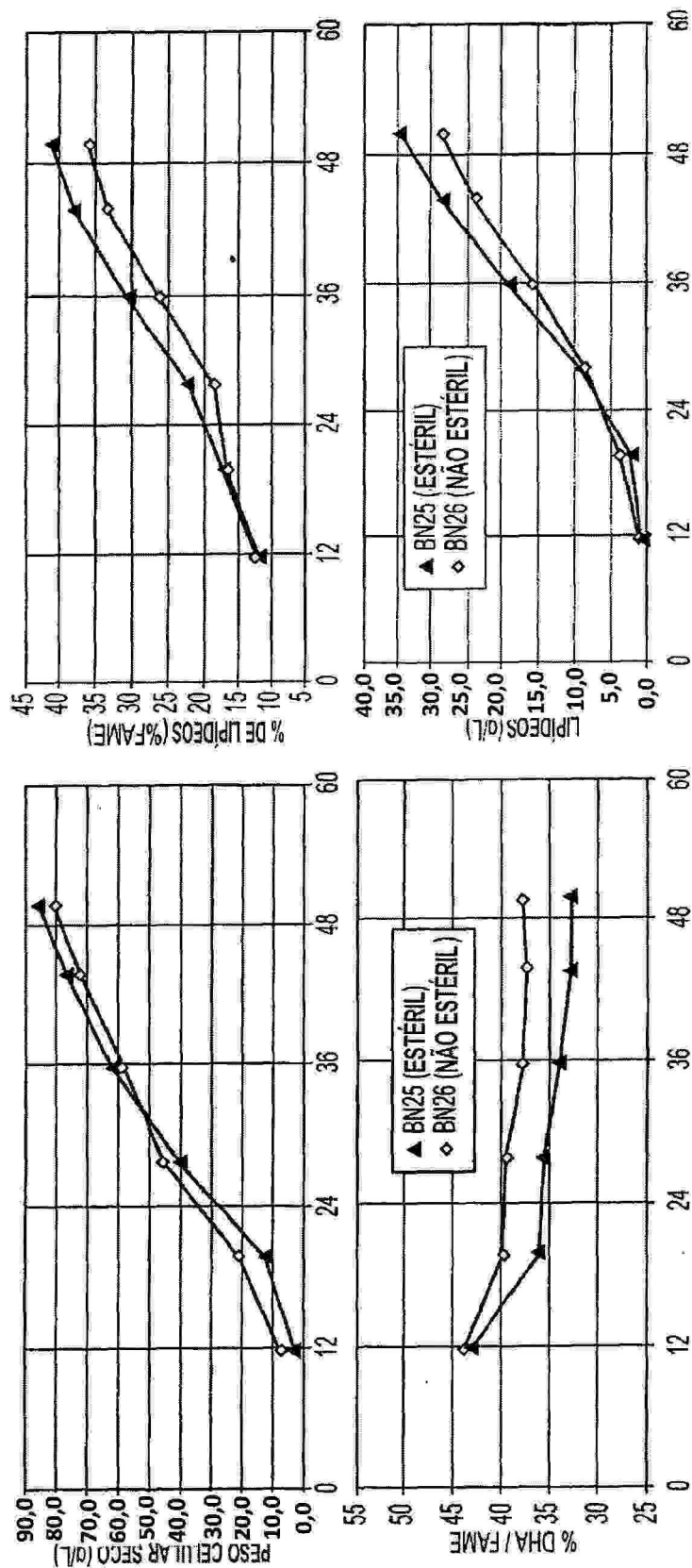


Fig.3

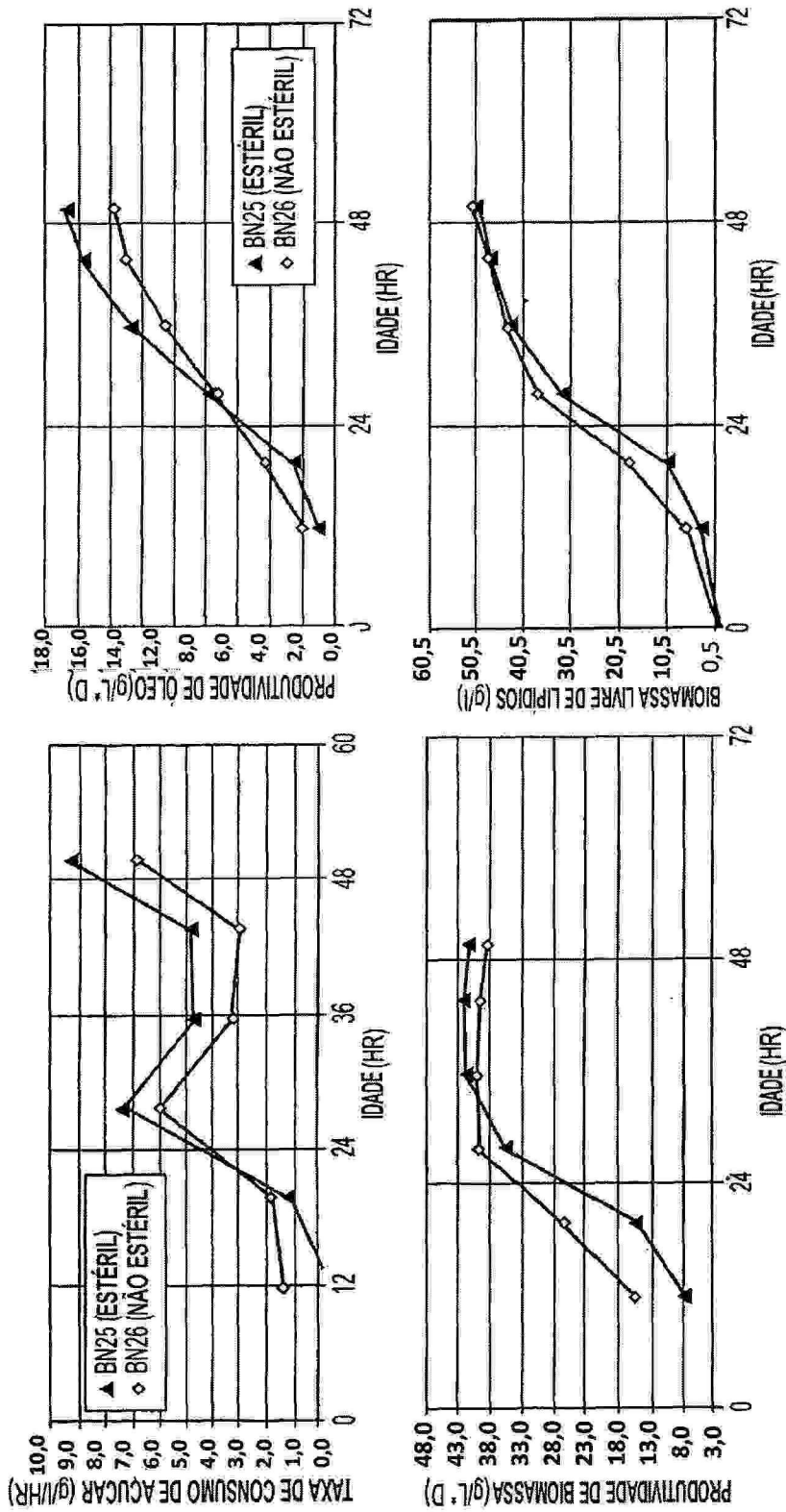


Fig.4

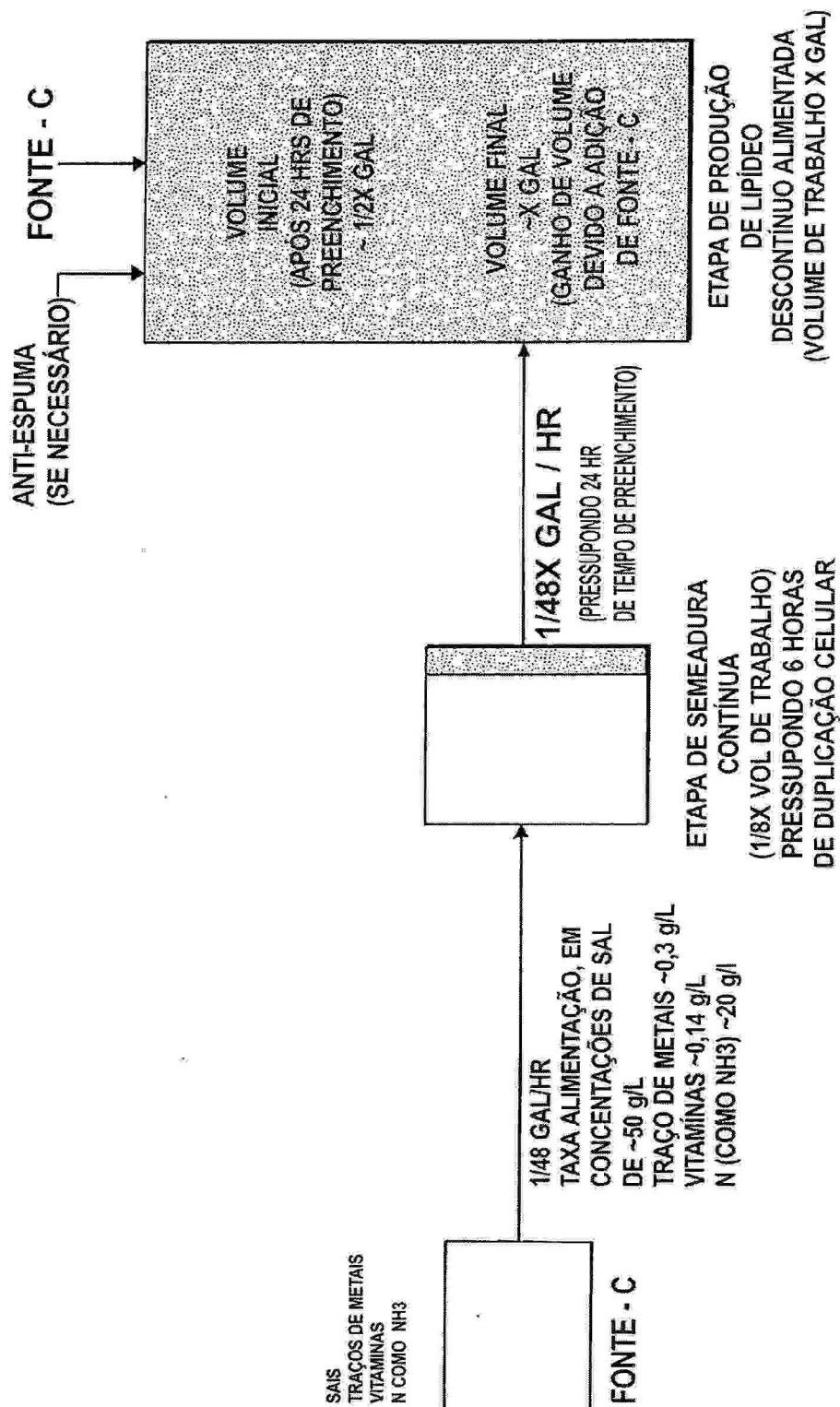


Fig.5