



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0613487-4 A2



\* B R P I 0 6 1 3 4 8 7 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 07/06/2006  
(43) Data da Publicação: 11/01/2011  
(RPI 2088)

(51) Int.Cl.:

C12N 1/12  
C12N 1/20  
C12M 1/00  
C12M 1/04  
C12P 1/00

(54) Título: PROCESSO HÍBRIDO EM BATELADA CONTÍNUA PARA PRODUÇÃO DE ÓLEO E OUTROS PRODUTOS ÚTEIS DE MICRÓBIOS FOTOSSINTÉTICOS

(30) Prioridade Unionista: 07/06/2005 US 60/688,396

(73) Titular(es): HR BIOPETROLEUM, INC.

(72) Inventor(es): DONALD G. REDALJE, MARK EDWARD HUNTLEY

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006022443 de 07/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/013899 de 01/02/2007

(57) Resumo: PROCESSO HIBRIDO EM BATELADA CONTÍNUA PARA PRODUÇÃO DE ÓLEO E OUTROS PRODUTOS ÚTEIS DE MICRÓBIOS FOTOSSINTÉTICOS, A presente invenção refere-se a um processo para cultivo de micróbios fotossintéticos compreendendo Sistemas Fechados para cultivo contínuo e Sistemas Abertos para cultivo em batelada, em que (a) a Área do Sistema Fechado não ocupa mais do que 20% da Área de Terra Total da facilidade de cultivo; (b) culturas em batelada nos Sistemas Abertos são iniciadas com um inóculo dos Sistemas Fechados contendo uma biomassa celular de não menos do que 5% da capacidade de transporte do referido Sistema Aberto; (c) a taxa de duplicação do referido micrório fotossintético não é menor que uma vez a cada 16 horas; e (d) o tempo de residência da cultura em batelada no referido sistema aberto não é maior do que um período de 5 dias.

**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PROCESSO HÍBRIDO DE BATELADA CONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE ÓLEO E OUTROS PRODUTOS ÚTEIS DE MICRÓBIOS FOTOSSINTÉTICOS".**

**Campo Técnico**

5        A presente invenção refere-se a um processo para produzir óleos e outros produtos úteis de micróbios fotossintéticos. O processo preferivelmente utiliza fontes de ponto grande de dióxido de carbono causadas por práticas de extração industrial ou de recursos, tais como gás de chaminé de usinas de poder de queima de combustível de fóssil (carvão, óleo e gás),  
10      desse modo reduzindo suas emissões de dióxido de carbono. O processo produz, produtos úteis, incluindo combustível renovável - óleos de planta que podem ser diretamente transformados em combustível de transporte de líquido tais como biodiesel.

15      O processo é potencialmente muito significante – tanto para reduzir as emissões globais de dióxido de carbono, quanto para produzir cargas de alimentação de biomassa como um material de partida para fabricar combustíveis e outros produtos úteis que são atualmente fabricados primariamente de geopetróleo. Primeiro, as usinas de poder de queima de combustível de fóssil, são atualmente responsáveis por cerca de um terço das emissões do mundo de dióxido de carbono – um assim chamado "gás de estufa" que os cientistas acreditam seja primariamente responsável por queima global. As fontes de ponto maior de produto de excreção de dióxido de carbono incluem (i) gases de chaminé de uma variedade de práticas industriais tais como a produção de produtos químicos e refino de óleo e gás, e (ii) emissões colaterais criadas pela extração geological de óleo e gás natural. Em segundo lugar, o processo descrito aqui emprega plantas microscópicas para diretamente usar o verdadeiro produto de excreção de dióxido de carbono criado por queima de combustíveis para criar ainda mais combustível, ou para usar o produto de excreção de dióxido de carbono criado por produção  
20      30      química para criar ainda mais produtos químicos. Mais importantemente, o uso de plantas microscópicas neste processo torna possível usar gases de chaminé antes eles serem emitidos na atmosfera – um feito que não pode

ser realizado plantas terrestres – e desse modo reduz as emissões atmosféricas.

Uma das principais razões pelas quais os micróbios fotossintéticos são superiores às plantas terrestres como uma fonte de carga de alimentação para biocombustíveis e produtos químicos com base biológica é que eles são aproximadamente 10 vezes mais produtivos, por área unitária. A baixa produtividade de plantas terrestres é um maior engarrafamento na produção de biocombustíveis, por que o material de carga de alimentação deve ser transportado para bioprocessar plantas para tais grandes distâncias que a quantidade de combustível consumido por transporte sozinho pode facilmente exceder a quantidade de biocombustível produzida, desse modo limitando o tamanho economicamente prático da usina de bioprocessamento. Usando micróbios fotossintéticos, que são cerca de 10 vezes mais produtivos, usinas de bioprocessamento podem ter capacidade de cerca de 10 vezes maior por que o custo e consumo de combustível de transporte da carga de alimentação da biomassa (os micróbios) é reduzido.

Os gases de chaminé de usina de força tipicamente contêm na faixa de 5% a 15% de dióxido de carbono, dependendo de se eles estão queimando óleo ou carvão, respectivamente. Excreções de gás de chaminé de processos de produção industrial contêm comparavelmente grandes quantidades de dióxido de carbono, e as correntes de excreção geradas durante a extração de recurso podem consistir em dióxido de carbono quase puro. Todas as usinas empregam dióxido de carbono e plantas microscópicas vivas em um meio aquático, e podem resistir – realmente freqüentemente requerem – concentrações de dióxido de carbono de 5% ou mais. As plantas terrestres, por outro lado, vivem em um meio gasoso (a atmosfera da Terra), que atualmente tem uma concentração de dióxido de carbono de cerca de 0,035%, e não podem resistir a concentrações cem vezes maiores encontradas em gases de chaminé.

Especificamente, esta invenção refere-se a um processo de cultivo de dois estágios, o "processo híbrido de batelada contínuo", onde as culturas aquosas de micróbios fotossintéticos (organismos de célula única,

incluindo bactérias, cianobactérias, e algas) são mantidas em um estado de crescimento exponencial contínuo sob condições suficientes de nutriente em um fotobioreator fechado, do qual uma fração é periodicamente removida para inocular uma cultura de batelada em um sistema de cultivo aberto onde

5 as condições iniciais de intensidade de luz elevada e concentrações de nutriente elevadas favorecem o crescimento exponencial continuado durante um breve período, porém onde os nutrientes são rapidamente exauridos e a luz torna-se o fator limitante devido à proliferação de células – condições que favorecem a biossíntese de óleo, resultando em teor de óleo celular mais

10 elevado. "Nutrientes", como aqui definido, são compreendidos dos assim chamados "Macronutrientes", que são compostos de nitrogênio e fósforo que são geralmente supridos em grandes quantidades e são o principal alimento para o crescimento, e os "Micronutrientes", que incluem vitaminas e compostos contendo metais de traço como ferro ou magnésio que são geralmente

15 supridos em quantidades muito pequenas. Em geral, o processo híbrido de batelada contínua produz produtividade de óleo maior do que pode ser obtido por um processo de estágio único, ou contínuo ou em batelada. Adicionalmente, a invenção fornece uma metodologia para o uso seguro de sistemas de cultivo aberto, que requerem muito menos habilidade e experiência

20 para operar do que os sistemas fechados, porém que têm provado ser de outro modo não confiável para cultivo em larga escala.

Os micróbios fotossintéticos são plantas de uma única célula que, como suas contrapartes terrestres multicelulares (células diferenciadas que são incapazes de sobreviver independentemente), produzem biomassa

25 que pode ser convertida em combustíveis e outros produtos úteis que são atualmente derivados quase que exclusivamente de combustíveis de fósseis não-renováveis. Realmente, os antepassados fossilizados destes micróbios fotossintéticos são a fonte dominante de reservas geológicas atualmente de carvão, óleo e gás. A biomassa de micróbios fotossintéticos atuais representa uma carga de alimentação renovável para uma variedade de produtos que incluem, porém não estão limitados a óleos, lubrificantes, plásticos, petroquímicas, e combustíveis. Os micróbios fotossintéticos são potencialmente

uma fonte muito melhor destes produtos do que as plantas terrestres, porque eles têm maior eficiência fotossintética, desenvolvem cerca de dez vezes mais rápido, e desse modo produzem mais biomassa por área unitária.

O teor de óleo de micróbios fotossintéticos é geralmente maior sob condições que favorecem baixas taxas de crescimento. Condições que favorecem altas taxas de crescimento e o maior teor de óleo são mutuamente exclusivas. Qualquer processo que produza tanto altas taxas de crescimento quanto alto teor de óleo no menor tempo claramente produziria a maior taxa total de produção de óleo. Entretanto, as condições que favorecem altas taxas de crescimento geralmente favorecem o maior teor de proteína.

#### Técnica Antecedente

Milhares de espécies de micróbios fotossintéticos são rotineiramente cultivados em escala relativamente pequena no laboratório, em vasos de cultura que variam de diversos mililitros até algumas centenas de litros em capacidade. Entretanto, tentativas de cultivar em escalas maiores, geralmente necessárias para produção comercial, têm se revelado bem-sucedidas para menos do que 10 espécies – a despeito de um esforço mundial que durou metade de um século e consumiu bilhões de dólares.

Existem dois tipos básicos de vasos de cultura que foram empregados no esforço de cultivar micróbios fotossintéticos em escala comercial: (1) Fotobiorreatores (Sistemas Fechados), e (2) Sistemas Abertos.

(1) Os Sistemas Fechados são caracterizados primariamente pela provisão de métodos de controlar o acesso à atmosfera. A permuta de gás com a atmosfera é deixada ocorrer sob condições controláveis. Dióxido de carbono entra no vaso de cultura como um combustível para crescimento, e oxigênio, o produto de excreção gasoso de fotossíntese é deixado escapar do vaso de cultura. (O carbono é assimilado em biomassa de planta, e o "dióxido" - oxigênio - é expelido.) Entretanto, a permuta de gás ocorre através de mecanismos de filtragem que são designados para proibir a entrada no vaso de cultura de quaisquer espécies de micrório fotossintético exceto aquele que está sendo preferencialmente cultivado aqui.

Sistemas Fechados são usualmente também designados para

permitir o controle de outras condições ambientais. A provisão para o controle de variáveis ambientais tais como temperatura, pH, condições nutrientes, e luz torna possível otimizar as condições de crescimento para diferentes espécies de plantas microbianas, que, como as plantas terrestres, têm preferências distintas para combinações únicas de tais variáveis.

Para um determinado grupo de condições ambientais, todas as espécies de micróbios fotossintéticos desenvolvem-se em sua taxa máxima dentro de uma faixa estreita de concentrações celulares. Consequentemente, alguns Sistemas Fechados são designados para operar como "turbidostats", onde a propriedade ótica de turvação (opacidade), que é uma função da concentração celular, é monitorada por meio de sensores programáveis que medem a densidade ótica do meio. O operador pode especificar uma faixa desejada de concentração celular aceitável, entre um baixo valor e um alto valor. O baixo valor corresponde diretamente a uma baixa densidade ótica específica (o "baixo ponto de fixação"), e o alto valor a uma alta densidade ótica específica (o "ponto de fixação elevado"). O sensor de densidade ótica é então programado consequentemente. Quando a densidade ótica atinge um valor que excede o ponto de fixação superior designado, o *turbidostat* ativa um mecanismo de controle que provê a remoção (coleta) de uma fração da cultura e a substitui com meio nutriente livre de célula, desse modo diluindo a concentração celular para produzir um valor de densidade ótica que compartilha o ponto de fixação menor designado. As células então se desenvolverão, aumentando em concentração até a densidade ótica atingir um valor que mais uma vez excede o ponto de fixação superior, tempo no qual o ciclo repete-se.

Preferivelmente, um vaso de cultura de Sistema Fechado é construído primariamente de material transparente, tal como vidro ou plástico, que permite a transmissão de radiação fotossinteticamente ativa (luz visível), porém que de outro modo separa o meio de cultura da atmosfera. Os vasos de cultura podem tomar muitas formas diferentes, porém eles todos compartilham em comum uma dimensão espacial que limita seu desempenho, e que sua profundidade relativa à intensidade de luz incidente. Esta

característica surge de uma propriedade básica de fotossíntese, a saber, aquela taxa fotossintética é limitada pela intensidade da luz. Desse modo, em qualquer determinada intensidade de luz, a taxa de fotossíntese de uma cultura celular é maximizada como uma função da área iluminada, isto é, a

5 área do meio de cultura que é exposta à luz (não necessariamente a Área de Superfície, que pode incluir áreas do vaso de cultura que não são expostas à luz). Considerar dois vasos de cultura, tanto ao ar livre quanto expostos à luz do sol. Um é no formato de um tanque retangular com lados e base sólidos, e o segundo é no formato de um cilindro transparente, colocado horizontalmente sobre o topo do chão. Para um tanque retangular a Área de Superfície inclui o topo, a base, e os lados do tanque, porém apenas a área de topo do meio de cultura é exposta à luz do sol. Para um tal tanque ao ar livre, então, a Área Iluminada é igual a menos do que a metade da Área de Superfície. Por comparação, para o cilindro transparente, a Área de Superfície é a

10 superfície inteira do cilindro e, não importa qual o tempo do dia, metade da Área de Superfície será sempre diretamente iluminada pela luz do sol. Desse modo, para o cilindro, a Área Iluminada é igual à metade da Área de Superfície.

15

Um segundo fator afetando a ligação entre a fotossíntese e a luz é a concentração celular no meio de cultura. Quanto maior a concentração celular dentro de um meio, menor a profundidade na qual a luz pode penetrar, por que a penetração de luz diminui aproximada e exponencialmente como uma função de concentração celular. Em outras palavras, se a concentração celular diminuir em uma taxa constante, a luz desaparece cada vez mais rápido. Em alguma profundidade em uma cultura celular, então, a luz realmente diminuirá para zero.

Como um assunto prático, a profundidade de cultura ideal para os micróbios fotossintéticos expostos à luz do sol abundante é geralmente na faixa de 10 a 20 centímetros. Nenhuma vantagem pode ser obtida fornecendo maior profundidade da cultura, por que a concentração de células por Área Iluminada permanecerá a mesma, e as células mais profundas não receberão luz suficiente. A profundidade ideal, então, coloca um limite sobre a

capacidade de operação normal de qualquer sistema de cultura, independente de sua Área Iluminada. Este fenômeno é um aspecto criticamente importante no planejamento de sistemas de cultivo. Volumes maiores requerem mais materiais, em custo maior, porém em algum ponto o aumento em 5 volume não fornece nenhum aumento em produtividade por Área Iluminada unitária.

Culturas de micróbios fotossintéticos geralmente requerem agitação ou mistura a fim de manter uma distribuição homogênea de células no meio. A tendência natural de micróbios fotossintéticos em água de destilaria 10 é formar agregações densas, nas quais as propriedades do meio são alteradas em detrimento da cultura. Em uma microescala, na agregação, a disponibilidade de luz e a concentração de nutrientes e gases torna-se muito diferente do restante do meio em que o crescimento é limitado. Algumas espécies têm apêndices conhecidos como cílios ou flagelos que as permite nadar; tais espécies móveis ("em movimento")ativamente formam agregações. 15 A maioria das espécies não-móveis é mais pesada do que a água e afundará, formando uma agregação passiva na base. Para prevenir tais agregações, Sistemas Fechados devem fornecer um método para criar turbulência usando dispositivos tais como pontes aéreas ou bombas.

20 (2) Sistemas Abertos diferem de Sistemas Fechados em um aspecto crítico, a saber que eles são abertos para a atmosfera. Este aspecto é vantajoso tanto para construção quanto para operação, de diversas maneiras. Primeiro, por que a Área Iluminada de um Sistema Aberto é exposta diretamente à luz do sol, não existe nenhuma exigência para uso de um material transparente para construir o vaso de cultura; isto fornece ampla latitude na escolha de materiais. Segundo, por que nenhum material é usado 25 para cobrir a Área Iluminada do Sistema Aberto, a quantidade e custo de material é reduzida em cerca da metade. Terceiro, Sistemas Abertos são geralmente mais fáceis de limpar do que os Sistemas Fechados. Em tempo prolongado a superfície interna de qualquer vaso de cultura tenderá a acumular uma película de crescimento microbiano. Em um Sistema Fechado o 30 acúmulo de uma tal película sobre a Área Iluminada absorverá luz; o conse-

quente decréscimo em intensidade de luz causa um decréscimo em produtividade. Tanto nos Sistemas Abertos quanto nos Sistemas Fechados a superfície do vaso de cultura pode acumular películas microbianas de espécies indesejáveis que podem ser prejudiciais ao crescimento e produção das espécies desejadas. Em qualquer dos casos, a superfície do vaso de cultura requererá limpeza ocasionalmente. Como uma matéria prática, os Sistemas Abertos permitem um escolha mais ampla de metodologias de limpeza. Por exemplo, pessoas e grandes tipos de equipamento de limpeza mecânicos tais como mangueiras, lavadoras de pressão, e escovas que não podem entrar no espaço confinado de um Sistema Fechado podem facilmente entrar em um Sistema Aberto.

A principal desvantagem de um Sistema Aberto é que, sendo aberto para a atmosfera, ele é suscetível à contaminação por espécies indesejadas. Alguém pode começar a operação de uma cultura de Sistema Aberto com apenas uma espécie desejada de micrório fotossintético. Entretanto, espécies indesejadas inevitavelmente serão introduzidas, seja por transporte atmosférico ou outros métodos. Quaisquer espécies indesejadas que desenvolvem-se mais rápido do que as espécies desejadas nas mesmas condições ambientais autocompetirão, em tempo prolongado, com as espécies desejadas e finalmente dominarão a cultura.

Em resumo, Sistemas Fechados são designados especificamente para proibir a contaminação por espécies indesejadas, com a expectativa de que o cultivo contínuo de uma espécie desejada pode ser possível durante um período muito maior do que seria possível em um Sistema Aberto. Entretanto, Sistemas Fechados são mais complicados para construir e operar. Os Sistemas Abertos fornecem uma escolha mais ampla de materiais para a construção, e também fornecem uma escolha mais ampla de metodologias de limpeza. Sistemas Fechados requerem práticas de operação adicionais, tais como o uso de técnica estéril durante transferências de fluido, que requerem maior tempo e perícia por parte do operador.

Diferenças teóricas entre os Sistemas Fechado e Sistemas Abertos têm surgido na prática. O primeiro micrório fotossintético foi isolado

da natureza e o desenvolvimento em cultura pura um pouco mais do que uma centena de anos atrás, porém não foi até os idos de 1930 que volumes suficientemente grandes de uma única espécie pode ser cultivada para permitir análise química. Pelos anos de 1940 várias espécies foram desenvolvidas em culturas de laboratório de cerca de 25 litros, e descobriu-se que, alterando as condições ambientais da cultura, o teor de óleo ou de proteína de algumas espécies pode ser feito exceder 60% da massa celular total.

As primeiras tentativas em cultura de larga escala começaram nos anos de 1950, estimuladas por interesse difundido em micróbios fotosintéticos como uma fonte de proteína econômica para alimentos e alimentações animais. Os primeiros Sistemas Abertos, construídos na Alemanha, tomaram a forma de canais adutores recirculantes, alongados, rasos, com fluxo fornecido por um dispositivo de roda propulsora. Programas nacionalmente consolidados desenvolveram-se rapidamente em todo o mundo, todos seguindo o projeto de "tanque aberto" alemão. Os primeiros tanques abertos tiveram capacidades de exatamente alguns milhares de litros. Nos últimos anos de 1950, capacidades de quase 100.000 litros foram atingidas e, pelos últimos anos sessenta, quase 1.000.000 litros. Tal aumento na capacidade trouxe economias de escala.

Centenas de espécies foram testadas no laboratório, e tentativas foram feitas para cultivar os melhores produtores de proteína em lagoas abertas durante os anos sessenta e setenta. Somente algumas espécies provaram ser tratáveis pelo cultivo prolongado. Estas poucas espécies, tal como *Spirulina platensis* e *Dunaliella salina*, continuaram para se tornar a base de produção comercial, efetuada em sistemas de lagoa abertos que cobre centenas de acres. As espécies comerciais bem sucedidas provaram ser "extremófilos", que prosperam em condições de pH ou salinidade extraordinariamente elevado. A maior parte das espécies prefere condições que prevalecem em natureza, onde numerosas espécies prosperam simultaneamente. Durante duas décadas, todas as tentativas para cultivar culturas de espécies únicas de não extremófilos em lagoas abertas falharam após menos do que alguns meses porque elas foram contaminadas por outras espécies que pro-

liferaram sob as mesmas condições ambientais.

Interesse renovado em cultivo de grande escala foi estimulado nos anos oitenta e noventa pelo prospecto de produzir biocombustíveis renováveis empregando óleos de micróbios fotossintéticos tal como uma carga de alimentação. Durante este período, as agências de governo dos Estados Unidos e Japão, por exemplo, investiram aproximadamente \$150 milhões em um tal esforço. Tais programas compartilharam dois objetivos: primeiro, coletar e identificar espécies de micróbios fotossintéticos que produzem concentrações elevadas de óleo e então determinar as condições ambientais sob as quais eles fazem isso; e, segundo, designar e demonstrar a operação de sistemas de cultivo de grande escala para a produção de cargas de alimentação de biocombustível empregando espécies que tenham sido desenvolvidas no laboratório. Ambos os programas tiveram sucesso no primeiro objetivo, porém falharam no segundo.

Os estudos de laboratório quantificaram resultados mais precoces. As coletas de cultura de centenas de espécies foram reunidas. Pesquisa em numerosas cepas demonstra que, em geral, a suficiência de nitrogênio (nitrogênio é necessário para síntese de proteína) promoveu taxas de crescimento elevadas e baixo teor de óleo, considerando que a deficiência de nitrogênio resultou em baixas taxas de crescimento e teor de óleo elevado. Para algumas espécies, foi também notado que a tensão, causada por fatores tal como intensidade elevada de luz ou temperaturas muito altas, pode induzir espécies a trocar de síntese de proteína para síntese de óleo. As espécies capazes de produção de óleo ideal – quanto maior o teor de óleo mais elevada a taxa de crescimento – foram selecionadas para experiências de produção de grande escala.

A produção de grande escala foi de novo tentada no final dos anos oitenta e começo dos anos noventa empregando sistemas de lagoa abertos. Os resultados operacionais foram similares àqueles obtidos durante as três décadas prévias. As espécies produtoras de óleo promissoras foram selecionadas das coletas, e as culturas foram inoculadas nas lagoas. Entretanto, como na experiência anterior, as culturas de espécies únicas não pu-

deram ser mantidas durante mais do que algumas semanas ou meses. O relatório final do programa dos Estados Unidos referiu-se a este fenômeno como uma "incerteza com a natureza de controle de espécies obtido".

Nos anos noventa os estados de cultivo de grande escala não progrediram além do ponto alcançado nos anos sessenta. Três tipos de microalgas - *Spirulina*, *Dunaliella* e *Chlorella* – foram cultivadas em instalações empregando sistemas de lagoa abertos cobrindo mais de 100 acres. As classificações de outras espécies foram tentadas mundialmente, porém todas as tentativas falharam. Os programas de biocombustíveis, em particular, foram incapazes de cultivar qualquer espécie desejada a qualquer escala fora do laboratório. Além disso, os programas de biocombustíveis focaram em tentativas para demonstrar as possíveis taxas de produção de biomassa mais altas sob suficiência de nutriente, condições que são conhecidas de estudos de laboratório para favorecer o baixo teor de óleo. Nenhuma tentativa foi feita em grande escala para maximizar a produção de óleo.

A tecnologia de Sistema Fechado de Grande Escala começou a receber atenção significante no começo dos anos noventa, uma vez que ficou evidente que as culturas da maior parte das espécies expostas à atmosfera não foram tratáveis. Naquele momento, os maiores Sistemas Fechados que foram algumas vezes empregados foram não mais do que alguns mil litros em capacidade. Os avanços na última década tiveram sucesso na capacidade de reator crescente por um fator de cerca de 10, a cerca de 30.000 litros. Porém isto não está em nenhuma parte próximo da taxa de aumento alcançada para capacidade de Sistema Aberto que, também durante uma década (nos anos cinqüenta a sessenta), aumentou por um fator de 1.000.

O limite superior da capacidade de Sistema Fechado é, em grande parte, uma consequência direta das exigências de designio inerentes. Todos os designs do Sistema Fechado básicos em uso hoje foram desenvolvidos primeiro nos anos cinqüenta, e podem ser categorizados como segue: (1) bolsas verticais, tubos, ou torres; (2) reatores de placa plana; e (3) tubos horizontais. Os sistemas verticais são constrangidos através de limitações de altura. Mesmo quando exposto a luz solar completa, a maior

parte das culturas alcança tais densidades de célula elevadas, cuja luz é quase completamente absorvida a uma distância de mais do que 15 a 20 cm da Área Iluminada. Este constrangimento limita o diâmetro do recipiente de cultura a não mais do que 30 ou 40 cm. Para alcançar uma capacidade de 5 mais do que 10.000 litros, por exemplo, um sistema vertical de 40 cm de diâmetro teria que ter mais de 80 metros (260 pés) de altura. Tais dimensões apresentam desafios claros em engenharia estrutural que, até mesmo se realizável, se tornam crescentemente complexos quanto maior o volume do sistema. Uma das soluções óbvias foi introduzir um sistema de iluminação 10 dentro do reator, porém experiências têm mostrado que isto apresenta outros problemas, dos quais a bio-sujeira pode ser o maior. Durante um tempo relativamente curto, a superfície da fonte de luz tende ser coberta com uma película microbiana, nitidamente reduzindo intensidade de luz e desse modo derrotando o propósito da fonte de luz. Para remover a cultura, limpar o recipiente é uma opção, porém dificilmente desejável se o objetivo é operação 15 contínua. Outra opção anti-sujeira comum, tornando a superfície da fonte de luz Tóxica aos micróbios, é claramente indesejável. Em geral, o uso de iluminação interna torna o sistema mais complexo.

Os sistemas horizontais tal como reatores de placa plana e tubos horizontais eliminam a necessidade pela construção estrutural requerida 20 de sistemas verticais. Empregando a superfície da terra para suporte estrutural, a capacidade potencial de tais sistemas poderia parecer ilimitada. Entretanto, a capacidade de sistemas horizontais é geralmente limitada pela exigência de fluxo turbulento, quer empregado para manter mistura adequada 25 ou carregar e esvaziar o recipiente de cultura.

O fluxo turbulento em um tubo ou um canal é descrito pelo número de Reynolds, definido como a velocidade do fluido multiplicada pelo "comprimento característico" do tubo ou canal, e dividido pela viscosidade do fluido. O número de Reynolds não tem qualquer unidade, como polegadas 30 ou libras, e é então "sem dimensão", tipo "um meio" ou "dois terços". O comprimento característico de um tubo carregado de fluido é seu diâmetro; o comprimento característico de um canal largo é sua profundidade. Pa-

ra um fluido de viscosidade constante, o fluxo se tornará crescentemente turbulento quando a velocidade do fluxo aumenta. A turbulência também aumenta em proporção ao comprimento característico; isto acontece porque as superfícies de canal e tubo são "pegajosas". As superfícies causam fricção 5 que reduz a velocidade do fluxo; a taxa de fluxo é quase zero próximo à superfície, e aumenta com a distância longe da superfície. Desse modo, em um tubo ou canal com comprimento característico pequeno, a fricção de superfície terá um grande efeito no fluxo médio. Em contraste, em um tubo ou canal com comprimento característico grande, a fricção de superfície terá 10 pequeno efeito sobre o fluxo médio, e a turbulência será maior.

A fricção de superfície também faz sentido em de distância. Imagine 15 um tubo muito longo pelo qual a água é impelida por uma bomba. Na origem, próxima a bomba, o fluxo é turbulento. Quanto mais o fluido se move para baixo do tubo, mais a superfície fica exposta a ele, quanto mais a superfície é exposta a ele, mais seu fluxo é reduzido por fricção. Em algum ponto da origem, a fricção acumulada removeu tanta energia do fluxo de fluido que deixa de ser turbulento. Isto acontece quando, o número de Reynolds cai para abaixo de um valor de cerca de 2000, e então o fluxo é referido ser "laminar".

O fluxo laminar não é desejável em culturas de célula porque em 20 tais condições as células têm uma tendência a se agrregar, ou afundando ou nadando. O fluxo turbulento previne tais agregações. Por exemplo, imagine como partículas de areia afundariam rapidamente para o fundo em uma lagoa imóvel, porém não faria assim em uma onda de rompimento grande ou uma movendo-se rapidamente.

Em resumo, então, o fluxo turbulento é mantido evitando-se 25 velocidades de fluido muito baixas, comprimentos característicos muito pequenos, e canais muito longos. O comprimento característico para Sistemas Fechados horizontais tal como reatores de placa plana ou tubos horizontais é a profundidade da cultura, que, como explicado previamente, tem um limite 30 superior prático de cerca de 20 cm. Alguém pode criar fluxo turbulento em um reator de placa plana ou um tubo horizontal com qualquer número de dispositivos tal como bombas ou suspensões pneumáticas. Entretanto, com

distância crescente da origem do fluxo, a energia turbulenta é perdida pela fricção tal que, a alguma distância finita o fluxo se torne laminar. Em condições de fluxo laminar as células da maior parte dos micróbios fotossintéticos afundarão para o fundo do reator. Isto é indesejável por muitas razões, a 5 mais importante das quais é que a colheita das células se torna problemática. Uma solução é fornecer energia mais turbulenta à fonte, porém isto é aceitável somente para um limite superior onde o cisalhamento mecânico danifica as próprias celas. Ainda outra solução é fornecer bombas múltiplas, por exemplo, ao longo do reator, porém esta abordagem introduz complexidades adicionais de ambos construção e operação.

Como um fato da prática, os Sistemas Fechados verticais são limitados a uma capacidade de menos do que cerca de 1.000 litros, e os Sistemas Fechados horizontais parecem ser limitados a capacidades de menos do que cerca de 50.000 litros. Com a finalidade de cultivo em grande escala 15 de micróbios fotossintéticos, os Sistemas Fechados são muito mais caros e complexos para construir e operar do que os Sistemas Abertos. Isto é porque cada sistema independente requer sua própria infra-estrutura independente: um conjunto de dispositivos ou mecanismos para fornecer mistura turbulenta, introdução e remoção de meio, e monitoramento e controle de variáveis tal como pH e temperatura. Para cobrir uma determinada área de terra com Sistemas Fechados requer pelo menos 10 vezes mais infra-estrutura do que cobrindo a mesma área de terra com Sistemas abertos, tornando o cultivo de sistema Fechado muito mais complicado.

Na prática, todo sistema de cultivo para micróbios fotossintéticos 25 envolve um acoplamento de Sistemas abertos e Sistemas Fechados em alguma escala. Todos os sistemas de cultivo, independente da escala, dependem no final das contas de seu inóculo original de células em coletas de cultura habitualmente mantidas ao redor do mundo. Todas as coletas de cultura exclusivamente mantêm suas culturas de célula em pratos Petri, tubos de 30 teste, ou frascos esterilizados – todos dos quais são, estritamente falando, Sistemas Fechados. Até mesmo os sistemas de produção em grande escala que podem ser considerados consistir "puramente" em Sistemas abertos têm

que depender definitivamente de um Sistema Fechado para fornecer o inóculo original.

O principal enigma técnico para a produção de micróbios fotossintéticos é que a tecnologia de Sistema aberto avançou para uma grande escala que é econômica e relativamente fácil de operar, porém não pode fornecer produção sustentável de micróbios desejados. Ao contrário, os Sistemas Fechados fornecem produção sustentável de micróbios desejados, porém até mesmo em sua grande escala, eles são dispendiosos e complicados de operar.

Desse modo, há uma necessidade para um método de produção que fornece produção sustentável reduzindo-se o potencial para contaminação e ainda não substancialmente aumenta a complexidade ou custo de construção ou operação.

É então um objetivo desta invenção fornecer um método eficaz para produção sustentável de micróbios fotossintéticos em grandes escalas o qual possa ser facilmente construído e não aumente a complexidade ou custo de construção ou operação.

É ainda um outro objetivo desta invenção fornecer um método de produção que seja especialmente adequado para otimizar a produção de óleos e outros produtos úteis de micróbios fotossintéticos. Os óleos e outros produtos úteis podem ser então extraídos e purificados da biomassa agregada por meio de uma variedade de métodos químicos.

#### Sumário da Invenção

Estes e outros objetivos são alcançados por uma metodologia de produção contínua-batelada de dois estágios, em que o primeiro estágio de produção contínua é realizado nos Sistemas Fechados e o segundo estágio da produção de batelada é realizado nos Sistemas Abertos. Primeiro, alguém deve selecionar (incluindo criar por, por exemplo, modificação genética) um micrório que é capaz de crescer a uma taxa de pelo menos uma duplicação a cada 16 horas, quando fornecido com gás carbônico suficiente, contanto que a luz e os nutrientes sejam adequados. Tal modificação genética é descrita, por exemplo, em "Transgenic microalgae as green cell-

factories", de R. Léon-Baños, D. González-Ballester, A. Gálvan e E. Fernández (em Trends in Biotechnology, Volume 22(1), pp. 45-52, 2004) que está aqui incorporado por referência. Por exemplo, é atualmente preferido praticar esta invenção com as seguintes espécies e/ou cepas: (i) cepa de 5 *Tetraselmis suecica*, "TETRA1" na University of Hawaii Culture Collection; cepa *Isochrysis galbana*, "ISOCH1" na University of Hawaii Culture Collection; (iii) *Phaeodactylum tricornutum*, ou cepa " PHAE01" ou "PHAE02" na University of Hawaii Culture Collection; ou (iv) *Nannochloropsis sp.*, em particular a cepa A. Sukenik strain empregada por Fabregas e outros (2004), 10 reportado em "The cell composition of *Nannochloropsis sp.* changes under different irradiances in semicontinuous culture", World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 20, pp. 31-35. A University of Hawaii Culture Collection inclui a coleta de cultura total de várias centenas de espécies e cepas amontoadas nos anos oitenta e noventa pelo U.S. Natural Renewable 15 Energy Laboratory (NREL), especificamente com a finalidade de produzir biocombustíveis de micróbios fotossintéticos. As espécies adicionais que também poderiam ser empregadas incluem *Dunaliella primolecta* e *Nitzschia closterium*. Em particular, os Sistemas Fechados deveriam compreender não mais do que 20% da Área de Terra Total de culturas, isto é, a área total ocupada pela Área de Sistema Fechado mais a Área de Sistema Aberto. Além disso, dado que cada espécie de micrório fotossintéticos atingem uma biomassa máxima por Área Iluminada de unidade sob um determinado conjunto 20 de condições ambientais ("capacidade de carga"), a quantidade de biomassa fornecida pelos Sistemas Fechados para iniciar ou "inocular" qualquer cultura de Sistema Aberto deveria ser igual a mais do que 5% da capacidade de carga do Sistema Aberto. Para maximizar a capacidade de carga das culturas de Sistema Aberto, elas deveriam ser fornecidas com nutrientes suficientes de forma que luz, não nutrientes, limite a capacidade de carga. Adicionalmente, nenhuma cultura de batelada em qualquer Sistema Aberto deveria 25 ser permitida para persistir durante um período (o "tempo de permanência") de mais do que 5 dias.

A limitação de 20% da Área de Terra Total ocupada pela Área

de Sistema Fechada assegura que a complexidade de construção e operação da facilidade de produção total seja minimizada. As provisões para o inóculo de biomassa mínimo e o tempo de permanência máximo, asseguram que os riscos de contaminação das culturas de Sistema Aberto através de 5 espécies indesejáveis são então reduzidos uma vez que devem ser inconsequentes. Este processo pode ser empregado por qualquer espécie de micrório fotossintético atende às exigências de taxa de crescimento declarada acima.

Descrição de uma Modalidade Preferida

10 É preferido que a Área de Terra Total em cultivo ativo em qualquer facilidade de produção seja compreendida de não mais do que 20 % da Área de Sistema Fechado e não menos do que 80 % da Área de Sistema Aberto. O cálculo da Área de Sistema Aberto para este propósito significa somente a Área Iluminada do meio de cultura nos Sistemas Abertos, assumindo 15 que todos os Sistemas Abertos na facilidade de produção contêm meio de cultura. O cálculo da Área de Sistema Fechada, entretanto, inclui ambas a "Área Plana" coberta pelos reatores e também qualquer "Área Inerte" entre recipientes de reator adjacentes. Por exemplo, imagine uma área de terra ocupada por uma série de Sistemas Fechados tubulares horizontais. A Área de 20 Plano será coberta pelos próprios reatores (por exemplo, um tubo longo de 3,048 m (10 pés), 0,3048 m (1 pé em diâmetro), cobre uma área de  $0,93 \text{ m}^2$  (10 pés quadrados)), e é igual a Área Iluminada do meio de cultura, porém pode haver Área Inerte adicional entre os tubos adjacentes que não é coberta pelos reatores. A área inteira de terra requerida pelos Sistemas Fechados, isto 25 é, a Área do Sistema Fechado, é a Área de Plano mais a Área Inerte. Por analogia, a área inteira desta página é requerida para escrever, porém a própria escritura ocupa somente uma fração da área total na página.

A provisão de 20% da Área do Sistema Fechado e 80% da Área do Sistema Aberto assegura maior eficiência porque a complexidade total de 30 construção e operação de qualquer facilidade de produção é substancialmente reduzida em comparação com uma facilidade que seria compreendida completamente de Sistemas Fechados.

É preferido que (1) a quantia de biomassa fornecida pelos Sistemas Fechados para inocular os Sistemas Abertos deva ser igual a mais do que 5% da capacidade de carga dos Sistemas Abertos agregados; (2) a taxa de crescimento das espécies que são cultivadas é maior do que aproximadamente um e uma meia duplicação por dia (isto é, a biomassa da célula dobra aproximadamente a cada 16 horas); e que (3) nenhuma cultura seja mantida em qualquer Sistema Aberto durante um período de mais do que 5 dias. A combinação destas três limitações assegura que, de forma alguma, a cultura deveria atingir uma biomassa do micrório desejado que é igual à pelo menos aproximadamente 90% da capacidade de carga em 5 dias ou menos. Isto é importante por várias razões. Primeiro, uma cultura que é inoculada a uma concentração de célula relativamente elevada (isto é, maior do que 5% da capacidade de carga) dominará o meio comparado a qualquer célula não desejada que possa ter sido introduzida inadvertidamente. Segundo, porque a maior parte das espécies crescem a taxas substancialmente menores do que 1 duplicação a cada 16 horas (1,5 duplicação por dia), uma espécie que é capaz de crescer isto rapidamente ultrapassará a maior parte dos competidores potenciais. Terceiro, a combinação do inóculo grande (maior do que 5% da capacidade de carga) e taxa de crescimento elevada (maior do que 1 duplicação a cada 16 horas) assegura que, dentro de 5 dias, a biomassa total estará muito próxima da capacidade de carga. Estas condições são importantes para (1) reduzir o risco de contaminação, e (2) promover a produção de biomassa total ou a biossíntese ou produção de óleo. Primeiro, um contaminante potencial teria que ter um inóculo grande e teria que crescer mais rapidamente do que as espécies desejadas para dominar o meio de cultura dentro de 5 dias. Segundo, a produção de óleo em particular é favorecida em culturas que estão próximas da capacidade de carga porque os recursos se tornam limitantes ao crescimento uma vez que a cultura passa 50% de capacidade de carga. Ao limitar os recursos favoráveis ao crescimento, alguém geralmente estimula a biossíntese de óleo.

É preferido que as culturas de célula sejam fornecidas até certo ponto com gás carbônico gasoso de um modo que permita o gás carbônico

- dissolver no meio. Este método não somente fornece uma fonte constante do carbono necessário para o crescimento, porém também tem o efeito de manter o pH mais ou menos constante do meio, sem que o pH tenda a aumentar uma vez que o gás carbônico é removido, conduzindo a condições desfavoráveis para crescimento. De forma ideal, o gás carbônico para este processo é fornecido através de emissões de fonte de ponto de processos de extração de recurso (tal como drenagem para óleo ou gás), ou dos processos de fabricações industriais ou usinas de força de queima de combustível de fóssil – todos dos quais envolvem um fluxo residual de gás que é rico em gás carbônico.
- 10 O processo descrito aqui evita emissão do gás carbônico residual na atmosfera e, ao contrário, o converte em biomassa potencialmente útil.

Alguém poderia melhorar nas condições preferidas. De forma ideal, alguém poderia rigorosamente abordar a capacidade de carga nos Sistemas Abertos agregados em um dia, o que também reduziria o potencial para contaminação. Isto poderia ser alcançado empregando um inóculo inicial de 15% de capacidade de carga do Sistema Aberto agregado para uma espécie com uma taxa de crescimento de mais de 6 duplicações por dia (equivalente a uma duplicação de biomassa de célula aproximadamente a cada 4 horas). Neste exemplo, imagine que as espécies crescem na mesma taxa em ambos Sistemas Fechados e Sistemas abertos, e que as espécies também atingem a mesma concentração de biomassa por área de unidade em ambos Sistemas Fechados e Sistemas abertos. Agora, se os Sistemas Fechados ocupam 20% da Área de Terra total, então um inóculo de 15% para os Sistemas Abertos seria obtido removendo-se 75% da cultura do Sistema Fechado (isto é,  $75\% \times 20\% = 15\%$ ). Empregando um inóculo de 15% nos Sistemas Abertos, a biomassa de célula dobraria para 30% nas primeiras 4 horas, para 60% nas próximas 4 horas, e em menos que as próximas 4 horas poderia alcançar 100% (isto é, sua capacidade de carga). Os Sistemas Fechados serão restaurados para sua biomassa de pré-inoculação em aproximadamente a mesma quantidade de tempo. Os Sistemas Fechados contêm somente 25% da sua biomassa original após o inóculo ser removido; nas primeiras 4 horas isto dobra para 50% da biomassa original, e no se-

gundo 4 horas, dobra novamente, este tempo para 100% da biomassa original. Neste exemplo, a capacidade de carga dos Sistemas Abertos é alcançada dentro de um dia e, no mesmo dia, a biomassa dos Sistemas Fechados é restaurada para o seu valor inicial. A taxa de crescimento exponencial 5 mais elevada registrada para micróbios fotossintéticos é menor do que cerca de 8 duplicações por dia (equivalente a uma duplicação a cada 3 horas), resultados ainda melhores poderiam ser alcançados em menos tempo com uma quantidade maior de inóculo inicial.

O método preferido, empregando uma espécie com uma taxa de crescimento maior do que cerca de 1,5 duplicação por dia, inoculando o Sistema Aberto com uma biomassa de pelo menos 5% de capacidade de carga, e colhendo a cultura antes de 5 dias após a inoculação, garante um teor de óleo relativamente elevado. Também garante que a cultura de Sistema Aberto não será significantemente contaminada, uma vez que décadas de experiência mostram que as culturas de Sistema Aberto normalmente levam mais 10 do que 5 dias - normalmente várias semanas - para serem contaminadas por espécies indesejadas.

Para praticar o método preferido é necessário primeiro determinar a capacidade de carga do Sistema Aberto. A capacidade de carga para a 20 maior parte das espécies fornecida com nutrientes em excesso em um ambiente de fluxo turbulento geralmente é na faixa de cerca de 100 a 500 gramas de peso seco por metro quadrado de Área Iluminada. As variações nessa faixa dependerão principalmente da intensidade de luz, mais especificamente da energia de luz diária total do sol, como o fator limitante. Por exemplo, a "irradiação" total (energia da luz do sol) em um dia ensolarado é aproximadamente duas vezes tanto quanto é em um dia nublado. A diferença correspondente na capacidade de carga seria aproximadamente a mesma, isto é, cerca de um fator de dois. Além disso, a irradiação média é maior nos trópicos, e diminui em latitudes mais altas. Por exemplo, a irradiação média 25 em Honolulu tropical é cerca de 40% maior do que em Nova Iorque, e cerca de 2 vezes maior do que no Alasca do norte. Conseqüentemente, a capacidade de carga média no Alasca seria somente a metade daquela no Havaí.

A maior irradiação do ano ocorre no dia mais longo do ano. Ao norte ou sul dos trópicos, isto acontece no primeiro dia de verão (o solstício de verão). Ao equador, a irradiação máxima diária acontece duas vezes por ano, quando o sol passa diretamente no céu no primeiro dia da primavera (o equinócio de primavera) e mais uma vez no primeiro dia de outono (o equinócio de outono). Em outro lugar nos trópicos, o máximo que irradiação diária também acontece duas vezes por ano, em alguns lugares entre os equinócios de primavera e outono.

A capacidade de carga de um sistema para uma espécie desejada de micróbio fotossintético deveria ser determinada empiricamente como segue. Se os Sistemas Abertos na facilidade de produção tiverem dimensões diferentes, então o cálculo de capacidade de carga deveria ser determinado para cada conjunto de sistemas que têm dimensões diferentes. Preferivelmente, a determinação de capacidade de carga deveria ser realizada em cerca de 15 dias do tempo quando a irradiação diária está em seu máximo anual. O Sistema Aberto deveria ser inoculado com um volume de cultura fornecido pelos Sistemas Fechados, e o Sistema aberto preencheu aproximadamente a capacidade operacional padrão com meio de nutriente. As concentrações de macronutriente (isto é, nitrogênio e fósforo inorgânico) deveriam ser fornecidas em excesso, definidas demonstrando-se que uma vez que a biomassa no Sistema Aberto alcançou seu máximo, os macronutrientes ainda estarão presentes em concentrações mensuráveis (os micróbios não terão comido toda a comida). Após a inoculação, as medições da biomassa do Sistema Aberto deveriam ser feitas medidas pelo menos várias vezes por dia até tal tempo quando a biomassa não aumente. A biomassa à qual o aumento cessa é a capacidade de carga. A determinação deveria ser repetida pelo menos várias vezes durante o período especificado, e a média destas determinações calculada para definir a capacidade de carga máxima.

A presente invenção foi descrita com respeito às modalidades atualmente preferidas descritas aqui, porém aqueles versados na técnica apreciarão que possa haver outras modalidades que se incluem no espírito e escopo da invenção. Desse modo a invenção não está limitada pelo o que é

descrito na especificação, porém é somente limitada pelas reivindicações. Por exemplo, esta invenção pode ser praticada com tipos diferentes de Sistemas Abertos e Sistemas Fechados. Além disso, esta invenção pode ser praticada com micróbios fotossintéticos com taxas de crescimento e capacidades de carga amplamente variadas, e não está limitado àquelas espécies que são cultivadas para seu teor de óleo, porém também pode incluir espécies que acumulam outros produtos de valor em culturas em batelada, quer ou não eles tenham atingido uma taxa máxima de produção de biomassa ou eles tenham deixado de crescer.

10 Aplicabilidade Industrial.

Esta invenção pode ser empregada sempre que desejado para produzir qualquer espécie específica de micrório fotossintético em um Sistema Aberto ao mesmo tempo em que evitando a contaminação substancial através de espécies indesejadas. A biomassa desse modo produzida de micróbios fotossintéticos pode ser empregada então como uma carga de alimentação renovável para fabricar produtos que agora contam quase exclusivamente com cargas de alimentação derivadas de depósitos de fóssil de carbono, isto é carvão, óleo e gás. Por exemplo, a fração de óleo de micróbios fotossintéticos pode ser extraída e quimicamente convertida para combustível de transporte, tal como biodiesel, ou para lubrificantes. Alternativamente, a carga de alimentação de biomassa pode ser empregada em um processo tal como gaseificação de leito fluidizado, pirólises, ou gaseificação de fluxo arrastado, da qual o material resultante pode ser empregado sucessivamente para fabricar combustíveis de transporte tal como biodiesel ou éter de dimetila, ou substâncias químicas de volume tal como metanol ou álcoois misturados ou, quanto ao assunto, qualquer produto que use combustíveis fósseis como um material de partida ou carga de alimentação. Adicionalmente, os produtos residuais contendo carbono de quaisquer dos processos acima poderiam produzir energia adicional por métodos tal como digestão anaeróbica, que produz metano (gás natural), ou co-queima com outros combustíveis em uma usina de energia para produzir eletricidade.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para cultivo de micróbios fotossintéticos, compreendendo:
  - selecionar uma espécie de micrório fotossintético capaz de duplicar-se em biomassa em aproximadamente 16 horas ou menos quando suprido com dióxido de carbono suficiente em um sistema aberto que tem uma capacidade de transporte;
  - introduzir a referida espécie em um sistema fechado;
  - permitir a referida espécie desenvolver-se em um sistema fechado em uma biomassa que excede 5% da referida capacidade de transporte do sistema aberto;
  - inocular uma biomassa inicial da referida espécie que não é menor do que 5% da referida capacidade de transporte do referido sistema fechado no referido sistema aberto;
  - 15 suprir o dióxido de carbono no referido sistema aberto continuamente, para suprir dióxido de carbono suficiente nos referidos micróbios e para substituir o dióxido de carbono removido pelos referidos micróbios; e
  - manter a referida espécie no referido sistema aberto para duplicar-se em biomassa aproximadamente a cada 16 horas ou menos durante 20 um período menor do que 5 dias.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o referido micrório fotossintético é selecionado do grupo consistindo em bactérias, cianobactérias e algas.
3. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida espécie duplica-se em biomassa no referido sistema aberto em uma taxa entre aproximadamente 1,5 duplicação por dia e até aproximadamente 8 duplicações por dia.
4. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida espécie duplica-se em biomassa no referido sistema aberto em uma taxa entre pelo menos uma vez a cada 16 horas e até uma vez a cada 3 horas.
5. Processo de acordo com a reivindicação 4, também compreendendo remover substancialmente tudo da referida espécie do referido

sistema aberto em mais de 5 dias após a referida etapa de inoculação.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida etapa de manutenção é realizada de modo que o desenvolvimento da referida espécie seja limitado pela disponibilidade de dióxido de carbono.

5        7. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida etapa de manutenção é realizada até após a referida espécie ter alcançado aproximadamente 90% da referida capacidade de transporte.

10      8. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida etapa de suprimento é realizada empregando-se gás de chaminé de uma fonte selecionada do grupo consistindo na queima de um diesel de fóssil, na produção industrial de químicos, ou na extração de diesel de fósseis de depósitos geológicos de diesel de fósseis.

15      9. Processo para sintetização de óleo, compreendendo:  
selecionar uma espécie de micróbio fotossintético que duplica-se em biomassa em aproximadamente 16 horas ou menos quando suprido com dióxido de carbono suficiente em um sistema aberto que tem uma capacidade de transporte;

20      introduzir a referida espécie em um sistema fechado;  
cultivar a referida espécie no referido sistema fechado até a referida espécie desenvolver-se em uma biomassa que excede 5% da referida capacidade de transporte do sistema aberto;

25      inocular uma biomassa inicial da referida espécie que não é menor do que 5% da referida capacidade de transporte do referido sistema fechado no referido sistema aberto;

30      suprir o dióxido de carbono no referido sistema aberto continuamente, para suprir dióxido de carbono suficiente nos referidos micróbios e para substituir o dióxido de carbono removido pelos referidos micróbios; e

manter a referida espécie no referido sistema aberto para duplicar-se aproximadamente a cada 16 horas ou menos durante um período menor do que 5 dias até a referida espécie atingir aproximadamente 90% da referida capacidade de transporte.

10. Processo para cultivo de micróbios fotossintéticos, compreendendo:

selecionar um micróbio fotossintético que tem uma taxa de desenvolvimento de pelo menos aproximadamente uma duplicação a cada 16 horas quando suprido com dióxido de carbono suficiente em um sistema aberto tendo uma capacidade de transporte;

10       cultivar o referido micróbio em um sistema fechado; inocular um sistema aberto com uma quantidade dos referidos micróbios do referido sistema fechado igual a aproximadamente 5% ou mais da referida capacidade de transporte;

suprir o dióxido de carbono no referido sistema aberto continuamente, para suprir dióxido de carbono suficiente nos referidos micróbios e para substituir o dióxido de carbono removido pelos referidos micróbios;

15       manter os referidos micróbios no referido sistema aberto para crescerem pelo menos na referida taxa de desenvolvimento, e

colher os referidos micróbios do referido sistema aberto menos do que aproximadamente 5 dias após a referida etapa de inoculação.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, também compreendendo:

20       manter o referido sistema aberto; desse modo o desenvolvimento dos referidos micróbios é limitado pela disponibilidade de dióxido de carbono.

12. Processo para criar estoque de alimentação de biomassa, compreendendo:

25       selecionar uma espécie de micróbio fotossintético que duplica-se em biomassa em aproximadamente 16 horas ou menos quando suprido com dióxido de carbono suficiente em um sistema aberto que tem uma capacidade de transporte;

30       introduzir a referida espécie em um sistema fechado até a referida espécie desenvolver-se em uma biomassa que excede 5% da referida capacidade de transporte;

inocular uma biomassa inicial da referida espécie que não é me-

nor do que 5% da referida capacidade de transporte do referido sistema fechado no referido sistema aberto;

- suprir o dióxido de carbono no referido sistema aberto continuamente, para suprir dióxido de carbono suficiente para a referida espécie e
- 5 para substituir dióxido de carbono removido pela referida espécie; e

manter a referida espécie no referido sistema aberto para duplicar-se aproximadamente a cada 16 horas ou menos durante um período menor do que 5 dias para criar um estoque de alimentação de biomassa.

13. Processo para usar o gás de chaminé, compreendendo:

- 10 selecionar uma espécie de micrório fotossintético que duplica-se em biomassa em aproximadamente 16 horas ou menos quando suprido com dióxido de carbono suficiente em um sistema aberto que tem uma capacidade de transporte;

introduzir a referida espécie em um sistema fechado;

- 15 suprir o referido gás de chaminé no referido sistema fechado;

permitir a referida espécie desenvolver-se em um sistema fechado e usar o referido gás de chaminé para desenvolver-se em uma biomassa que excede 5% da referida capacidade de transporte do sistema aberto;

- 20 inocular uma biomassa inicial da referida espécie que não é menor do que 5% da referida capacidade de transporte do referido sistema fechado no referido sistema aberto;

suprir o referido gás de chaminé no referido sistema aberto continuamente, para suprir dióxido de carbono suficiente para a referida espécie e substituir dióxido de carbono removido pela referida espécie, e

- 25 manter a referida espécie no referido sistema aberto para duplicar-se em biomassa aproximadamente a cada 16 horas ou menos durante um período menos do que 5 dias.

14. Processo para sintetização de óleo, compreendendo:

- Selecionar os micróbios fotossintéticos que duplicam-se em biomassa em aproximadamente 16 horas ou menos quando suprido com dióxido de carbono suficiente em um tanque aberto tendo uma capacidade de transporte;
- 30

Injetar os gases de chaminé tendo concentrações de dióxido de carbono de pelo menos 3,5% em um fotobiorreator tendo uma profundidade de cultura máxima de aproximadamente 20 centímetros, em que os referidos gases de chaminé são selecionados da fonte consistindo em queima de um

- 5 diesel de fóssil, produção industrial de químicos, refino de óleo e gás, e extração geológica de diesel de fósseis;

introduzir referidos micróbios no referido fotobioreator;

prover os referidos micróbios com nutrientes suficiente no referido fotobiorreator para evitar que os nutrientes sejam um fator limitante para desenvolvimento;

- mistura turbulenta dos referidos micróbios através do referido fotobiorreator, por meio do qual os referidos micróbios sofram desenvolvimento exponencial contínuo no referido fotobiorreator;

inocular uma biomassa inicial dos referidos micróbios que não é

- 15 menor do que 5% da referida capacidade de transporte do referido tanque aberto do referido fotobiorreator fechado no referido tanque aberto;

suprir o dióxido de carbono no referido sistema aberto continua-

mente, para suprir dióxido de carbono suficiente nos referidos micróbios para substituir dióxido de carbono removido pelos referidos micróbios; e

- manter referidos micróbios no referido tanque aberto com elevadas concentrações de nutriente durante mais 5 dias, por meio do qual as condições iniciais de intensidade elevada de luz e elevadas concentrações de nutriente favorecem o desenvolvimento exponencial contínuo durante um curto período, porém em que o desenvolvimento torna-se limitado pela disponibilidade de nitrogênio que inibe a síntese de proteína, por meio da qual o conteúdo de óleo é aumentado.

15. Processo para biossíntese de óleo, compreendendo:

selecionar os micróbios fotossintéticos que duplicam-se em biomassa em aproximadamente 16 horas ou menos quando suprido com dióxido de carbono suficiente em um tanque aberto tendo uma capacidade de transporte;

dissolver gases de chaminé tendo concentrações de dióxido de

carbono de pelo menos 3,5% em um meio de cultura em um fotobiorreator tendo uma profundidade de cultura máxima de aproximadamente 20 centímetros, em que os referidos gases de chaminé são selecionados de uma fonte selecionada do grupo consistindo na queima de um diesel de fóssil,  
5 produção industrial de químicos, refino de diesel de fósseis, e extração geológica de diesel de fósseis;

introduzir referidos micróbios no referido meio no referido fotobioreator;

prover os referidos micróbios com nutrientes suficiente no referido meio para evitar que os nutrientes sejam um fator limitante para desenvolvimento; mistura turbulenta dos referidos micróbios no referido meio através do referido fotobiorreator para fornecer uma distribuição substancialmente homogênea dos referidos micróbios no referido meio, por meio do qual os referidos micróbios sofrem desenvolvimento exponencial contínuo no referido fotobiorreator;  
15

inocular uma biomassa inicial dos referidos micróbios que não é menor do que 5% da referida capacidade de transporte do referido tanque aberto do referido fotobiorreator fechado no referido tanque aberto;

suprir os gases de chaminé tendo concentrações de dióxido de carbono de pelo menos 3,5% no referido tanque aberto continuamente, para suprir dióxido de carbono suficiente nos referidos micróbios e para substituir o dióxido de carbono removido pelos referidos micróbios, em que referidos gases de chaminé são selecionados de uma fonte selecionada do grupo consistindo na queima de um diesel de fóssil, produção industrial de químicos, refino de diesel de fósseis, e extração geológica de diesel de fósseis; e  
25

manter os referidos micróbios no referido tanque aberto com elevadas concentrações de nutriente durante mais 5 dias, por meio do qual as condições iniciais de intensidade elevada de luz e elevadas concentrações de nutriente favorecem desenvolvimento exponencial contínuo durante um curto período, porém em que o desenvolvimento torna-se limitado pela disponibilidade de nitrogênio que inibe a síntese de proteína, por meio da qual o conteúdo de óleo é aumentado.  
30

16. Processo para sintetizar biomassa em uma área de terra, compreendendo:

selecionar os micróbios fotossintéticos que duplicam-se em biomassa em aproximadamente 4 horas ou menos quando suprido com dióxido de carbono suficiente em um tanque aberto tendo uma capacidade de transporte;

introduzir referidos micróbios em um fotobiorreator tendo uma profundidade de cultura máxima de aproximadamente 20 centímetros, em que referido fotobiorreator ocupa menos do que 20% da referida área de terra,

prover os referidos micróbios com nutrientes suficiente no referido fotobiorreator para evitar que os nutrientes sejam um fator limitante para desenvolvimento;

mistura turbulenta dos referidos micróbios através do referido fotobiorreator, por meio do qual referidos micróbios sofram desenvolvimento exponencial contínuo no referido fotobiorreator;

inocular uma biomassa inicial dos referidos micróbios que não é menor do que 15% da referida capacidade de transporte do referido fotobiorreator no referido tanque aberto, em que o referido tanque ocupa mais do que 80% da referida área de terra;

suprir o dióxido de carbono no referido tanque aberto continuamente, para suprir dióxido de carbono suficiente nos referidos micróbios um para substituir dióxido de carbono removido pelos referidos micróbios; e

manter referidos micróbios no referido tanque aberto com elevadas concentrações de nutriente durante mais 1 dia, por meio do qual as condições iniciais de intensidade elevada de luz e elevadas concentrações de nutriente favorecem o desenvolvimento exponencial contínuo durante um curto período, porém em que o desenvolvimento torna-se limitado pela luz devido à proliferação celular.

30 17. Processo para biossíntese de óleo, compreendendo:

selecionar os micróbios fotossintéticos que duplicam-se em biomassa em aproximadamente 16 horas ou menos quando suprido com dióxi-

do de carbono suficiente em um tanque aberto tendo uma capacidade de transporte;

5 dissolver gases de chaminé tendo concentrações de dióxido de carbono de pelo menos 3,5% em um meio de cultura em um fotobiorreator tendo uma profundidade de cultura máxima de aproximadamente 20 centímetros, em que referidos gases de chaminé são selecionados de uma fonte selecionada do grupo consistindo na queima de um diesel de fóssil, produção industrial de químicos, refino de diesel de fósseis, e extração geológica de diesel de fósseis;

10 introduzir referidos micróbios no referido meio no referido fotobioreator;

15 prover os referidos micróbios com nutrientes suficiente no referido meio para evitar que os nutrientes sejam um fator limitante para desenvolvimento; mistura turbulenta dos referidos micróbios no referido meio através do referido fotobiorreator, por meio do qual os referidos micróbios sofrem desenvolvimento exponencial contínuo no referido fotobiorreator;

inocular uma biomassa inicial dos referidos micróbios que não é menor do que 5% da referida capacidade de transporte do referido tanque aberto do referido fotobiorreator fechado no referido tanque aberto;

20 suprir o dióxido de carbono no referido tanque aberto continuamente, para suprir dióxido de carbono suficiente nos referidos micróbios para substituir dióxido de carbono removido pelos referidos micróbios; e

25 manter os referidos micróbios no referido tanque aberto com elevadas concentrações de nutriente durante mais 5 dias, por meio do qual as condições iniciais de intensidade elevada de luz e elevadas concentrações de nutriente favorecem desenvolvimento exponencial contínuo durante um curto período, porém em que o desenvolvimento torna-se limitado pela disponibilidade de nitrogênio que inibe a síntese de proteína, por meio da qual o conteúdo de óleo é aumentado.

30 18. Processo para sintetizar o estoque de alimentação de biomassa, compreendendo:

selecionar os micróbios fotossintéticos que duplicam-se em bio-

massa em aproximadamente 4 horas ou menos quando suprido com dióxido de carbono suficiente em um tanque aberto tendo uma capacidade de transporte;

dissolver gases de chaminé tendo concentrações de dióxido de carbono de pelo menos 3,5% em um meio de cultura em um fotobiorreator tendo uma profundidade de cultura máxima de aproximadamente 20 centímetros, em que referidos gases de chaminé são selecionados de uma fonte selecionada do grupo consistindo na queima de um diesel de fóssil, produção industrial de químicos, refino de diesel de fósseis, e extração geológica de diesel de fósseis;

introduzir referidos micróbios no referido meio no referido fotobioreator;

prover os referidos micróbios com nutrientes suficiente no referido meio para evitar que os nutrientes sejam um fator limitante para desenvolvimento;

mistura turbulenta dos referidos micróbios no referido meio através do referido fotobiorreator, por meio do qual referidos micróbios sofram desenvolvimento exponencial contínuo no referido fotobiorreator;

inocular uma biomassa inicial dos referidos micróbios que não é menor do que 15% da referida capacidade de transporte do referido tanque aberto do referido fotobiorreator fechado no referido tanque aberto;

suprir o dióxido de carbono no referido tanque aberto continuamente, para suprir dióxido de carbono suficiente nos referidos micróbios para substituir dióxido de carbono removido pelos referidos micróbios; e

manter referidos micróbios no referido tanque aberto com elevadas concentrações de nutriente durante mais 1 dia, por meio do qual as condições iniciais de intensidade elevada de luz e elevadas concentrações de nutriente favorecem o desenvolvimento exponencial contínuo durante um curto período, porém em que o desenvolvimento torna-se limitado pela luz devido à proliferação celular.

19. Dispositivo para cultivar os micróbios fotossintéticos em uma área de terra, compreendendo:

um ou mais vasos de cultura transparentes à luz visível, cada vaso de cultura fornecendo uma profundidade de cultura de mais 40 centímetros, em que os referidos vasos de cultura abrangem uma área de terra da referida área de terra e porções da referida área de terra entre os referidos vasos de cultura define uma área inerte;

5 um meio de nutriente em cada um dos referidos vasos de cultura, em que o referido fluxo turbulento é suficientemente baixo para prevenir cisalhamento mecânico de células danificadas, os referidos vasos de cultura, o referido meio de nutriente e o referido fluxo turbulento destinam-se a definir 10 um ou mais fotobiorreatores;

em que a referida área de terra e a referida área inerte não ocupam mais do que 20% da referida área de terra; e

um ou mais tanques, cada um tendo uma capacidade de transporte, que juntamente não ocupam menos do que 80% da referida área de 15 terra; por meio do qual uma biomassa de micróbios compreendendo pelo menos 5% da referida capacidade de transporte para cada um dos referidos tanques abertos poder ser inoculados a partir dos referidos fotobiorreatores nos referidos tanque aberto.

P106134874

## RESUMO

Patente de Invenção: "**PROCESSO HÍBRIDO EM BATELADA CONTÍNUA PARA PRODUÇÃO DE ÓLEO E OUTROS PRODUTOS ÚTEIS DE MICRÓBIOS FOTOSSINTÉTICOS**".

5 A presente invenção refere-se a um processo para cultivo de micróbios fotossintéticos compreendendo Sistemas Fechados para cultivo contínuo e Sistemas Abertos para cultivo em batelada, em que (a) a Área do Sistema Fechado não ocupa mais do que 20% da Área de Terra Total da facilidade de cultivo; (b) culturas em batelada nos Sistemas Abertos são iniciadas com um inóculo dos Sistemas Fechados contendo uma biomassa celular de não menos do que 5% da capacidade de transporte do referido Sistema Aberto; (c) a taxa de duplicação do referido micróbio fotossintético não é menor que uma vez a cada 16 horas; e (d) o tempo de residência da cultura em batelada no referido sistema aberto não é maior do que um período de 5 dias.

10

15