



**Assinado
Digitalmente**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1014451-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1014451-0

(22) Data do Depósito: 14/04/2010

(43) Data da Publicação do Pedido: 21/10/2010

(51) Classificação Internacional: C12P 7/64.

(30) Prioridade Unionista: US 61/169,271 de 14/04/2009; US PCT/US2009/060692 de 14/10/2009; US 61/299,250 de 28/01/2010; US PCT/US2009/066142 de 30/11/2009; US PCT/US2009/066141 de 30/11/2009.

(54) Título: MÉTODOS PARA EXTRAIR ÓLEOS TRIGLICERÍDEOS A PARTIR DE BIOMASSA DE MICROALGA

(73) Titular: TERRAVIA HOLDINGS, INC., Pessoa Jurídica. Endereço: 225 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US), Norte Americana

(72) Inventor: JON WITTENBERG; FELIPE ARANA.

Código de Controle: 4D3F390F250ECE81 77F418DB2C06AF69

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 14/04/2010, observadas as condições legais

Expedida em: 18/12/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODOS PARA EXTRAIR ÓLEOS TRIGLICERÍDEOS A PARTIR
DE BIOMASSA DE MICROALGA".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício de acordo com 35 USC 119 (e) do Pedido Provisório US 61/169.271, depositado em 14 de abril de 2009, e Pedido Provisório US 61/299.250, depositado em 28 de janeiro de 2010. Este Pedido é também uma continuação em parte do Pedido Internacional PCT/US2009/060692, depositado em 14 de outubro de 2009. Este Pedido é também uma continuação em parte dos Pedidos Internacionais PCT/US2009/066142 e PCT/US2009/066141, ambos os quais depositados em 30 de novembro de 2009. Cada um destes pedidos é incorporado neste documento por referência em sua totalidade para todos os propósitos.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] Este pedido inclui uma listagem de sequências, como mostrado nas páginas 1 a 21 apenas.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] Esta invenção geralmente refere-se à produção e extração de óleo a partir de micro-organismos. Em particular, a invenção fornece métodos para extração, recuperação, isolamento e obtenção de óleo a partir de um micro-organismo e composições que compreendem o óleo. A invenção refere-se, conseqüentemente, ao campo da biologia, microbiologia, tecnologia de fermentação e tecnologia de produção de óleo e combustível.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] Combustível fóssil é um termo geral para depósitos geológicos combustíveis de materiais orgânicos formados a partir de animais e plantas que tenham sido convertidos em óleo bruto, carvão,

gás natural, ou óleos pesados por exposição a calor e pressão na crosta terrestre ao longo de centenas de milhões de anos.

[005] Os combustíveis fósseis são um recurso finito não renovável. Com a modernização global nos séculos 20 e 21, a demanda por energia de combustíveis fósseis, especialmente gasolina derivada de petróleo, está crescendo e tem sido a causa de grandes conflitos regionais e globais. Ademais, a demanda aumentada por energia também aumentou o custo dos combustíveis de hidrocarbonetos. Além de energia, muitas indústrias, incluindo as indústrias de produção de plásticos e químicas, são dependentes da disponibilidade de hidrocarbonetos como matéria-prima para a produção. Alternativas para as atuais fontes de abastecimento ajudariam a mitigar a pressão sobre esses custos de matérias-primas.

[006] Lipídios para uso em biocombustíveis podem ser produzidos em micro-organismos, tal como algas, fungos e bactérias. Tipicamente, a fabricação de um lipídio em um micro-organismo envolve micro-organismos em crescimento, como algas, fungos ou bactérias, que são capazes de produzir um lipídio desejado em um fermentador ou biorreator, isolando a biomassa microbiana, secando-a e extraíndo os lipídios intracelulares, que são uma forma de óleo. No entanto, esses processos são geralmente considerados como ineficientes e caros, particularmente quando se considera a escala na qual eles devem ser conduzidos para produzir fontes significativas de combustível. Um problema significativo com estes processos é a extração dos lipídios ou óleo a partir de um micro-organismo.

[007] Há uma necessidade de um processo para extração de óleo de micro-organismos que mitiga os problemas de baixa eficiência e alto custo dos métodos atuais para a extração de lipídios de micro-organismos. A presente invenção fornece esse processo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] A presente invenção fornece métodos para a extração de lipídios/óleo de biomassa microbiana. Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para extrair óleo de biomassa microbiana, o dito método compreendendo as etapas de submeter a biomassa microbiana seca com um teor de umidade de menos que 6% em peso e que constitui pelo menos 20% de óleo em peso e calor condicionada a uma temperatura na faixa de 71,1°C a 148,9°C (160°F a 300°F) a uma pressão suficiente para extrair mais do que 5% de óleo em peso da biomassa de modo que óleo extraído e biomassa gasta de conteúdo de óleo reduzido sejam produzidos. Em várias modalidades, mais do que 75% do óleo em peso na biomassa microbiana seca são extraídos da biomassa na etapa de prensagem.

[009] Assim, este método compreende a secagem e, em seguida, condicionamento da biomassa microbiana para produzir matéria-prima condicionada que é, então, submetida à pressão. O condicionamento altera as propriedades físicas e/ou físico-químicas da biomassa, mas não causa a liberação de mais do que 5% de óleo na biomassa. A etapa de condicionamento compreende o aquecimento da biomassa microbiana seca a uma temperatura na faixa de 71,1°C a 148,9°C (160°F a 300°F), alterando assim seu conteúdo de umidade. Em várias modalidades, um "agente de volume" ou "auxiliar de prensagem" é adicionado à biomassa microbiana ou a matéria-prima condicionada antes da aplicação de pressão durante a etapa de prensagem. Durante a etapa de prensagem, a matéria-prima condicionada é submetida a uma pressão suficiente para separar pelo menos 5% do óleo na biomassa ou matéria-prima condicionada de outros componentes. Estes outros componentes estão contidos na "biomassa gasta", que pode incluir o óleo residual, mas em qualquer caso, tem reduzido teor de óleo em relação à matéria-prima condicionada. Em uma modalidade, a pressão é exercida por uma prensa expelidora.

[0010] Em várias modalidades deste e de outros aspectos da invenção, a biomassa é preparada por fermentação de um micróbio selecionado do grupo que consiste em microalgas, bactérias oleaginosas, levedura oleaginosa e fungos. Em várias modalidades, a microalga é uma espécie de um gênero selecionado de *Chlorella*, *Parachlorella*, ou *Prototheca*, ou é uma das outras espécies na tabela 1, abaixo. Em várias modalidades, a bactéria oleaginosa é uma espécie do gênero *Rhodococcus*. Em várias modalidades, a levedura oleaginosa é *Rhodotorula glutinis* ou outra espécie listada na tabela 2, abaixo. Em várias modalidades, o fungo é uma espécie listada na tabela 3, abaixo.

[0011] Em várias modalidades deste e de outros aspectos da invenção, a biomassa é preparada por fermentação de um micróbio que contém ácido graxo 18:1. Em várias modalidades, o micróbio tem um perfil de ácidos graxos de menos do que 2% de C14:0; cerca de 13 a 16% de C16:0; cerca de 1 a 4% de C18:0; cerca de 64 a 71% de C18:1; cerca de 10 a 15% de C18:2; cerca de 0,5 a 2% p/p de C18:3 e menos do que 1% de comprimento de cadeia de carbono 20 ou mais longo. Em várias modalidades, o micróbio tem um perfil de ácidos graxos de cerca de 1 a 2% de C14:0; cerca de 20% de C16:0; cerca de 4% de C18:0; cerca de 64% de C18:1; e cerca de 7 a 8% de C18:2. Em algumas modalidades, o micróbio tem um perfil de ácidos graxos de cerca de C14:0 (1,65); C16:0 (28,0); C18:0 (2,90); C18:1 (53,80); C18:2 (10,95) e C18:3 alfa (0,80). Em outras modalidades, o micróbio tem um perfil de ácidos graxos de C14:0 (2,33); C15:0 (9,08); C16:0 (24,56); C16:1 (11,07); C17:0 (10,50); C18:0 (2,49); C18:1 (17,41); C18:2 (0,05). Ainda em outras modalidades, o micróbio tem um perfil de ácidos graxos de C12 (menos do que 1%); C14:0 (2,18 a 3,36); C15:0 (0,12 a 0,25); C16:0 (29,94 a 33,26); C16:1 (0,49 a 0,76); C17:0; C18:0 (6,88 a 8,17); C18:1 (42,68 a 48,12); C18:2 (7,88 a 9,28) C18:3 alfa (0,84 a 1,33) e maior do que C:20 (1,1 a 1,45). Em várias modalidades, o micróbio tem menos

do que 0,5% de DHA. Nestas e em outras modalidades o micróbio é, em alguns casos, uma microalga.

[0012] Em várias modalidades deste e de outros aspectos da invenção, a biomassa microbiana (seca ou hidratada) ou matérias-primas condicionadas contêm pelo menos 25% de óleo (lipídios) em peso. Em várias modalidades, a biomassa microbiana seca ou matéria-prima condicionada contém óleo pelo menos 25% de óleo por peso seco de célula. Em várias modalidades, a biomassa microbiana seca ou matéria-prima condicionada contém pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 75% de óleo por peso seco de célula. Em várias modalidades, a biomassa microbiana seca ou matéria-prima condicionada contém pelo menos 15% de carboidratos em peso seco de célula.

[0013] Em várias modalidades deste e de outros aspectos da invenção, a etapa de condicionamento envolve a aplicação de calor e/ou pressão à biomassa. Em várias modalidades, a etapa de condicionamento compreende aquecimento da biomassa, a uma temperatura na faixa de 71,1°C a 148,9°C (160°F a 300°F). Em várias modalidades, o aquecimento é realizado usando um agitador empilhado vertical. Em várias modalidades, a etapa de condicionamento compreende tratar a biomassa seca com um expansor ou extrusor para formar e/ou homogeneizar a biomassa. Em várias modalidades, a biomassa seca ou matéria-prima condicionada tem um teor de umidade de menos que 5% em peso. Em várias modalidades, a biomassa seca ou matéria-prima condicionada tem um teor de umidade na faixa de 0,1% e 5% em peso. Em várias modalidades, a biomassa seca ou matéria-prima condicionada tem um teor de umidade menor do que 4% em peso. Em várias modalidades, a biomassa seca ou matéria-prima condicionada tem um teor de umidade na faixa de 0,5% e 3,5% em peso. Em várias modalidades, a biomassa seca ou matéria-prima

condicionada tem um teor de umidade na faixa de 0,1% e 3% em peso.

[0014] Em várias modalidades deste e de outros aspectos da invenção, um agente de volume é adicionado à biomassa microbiana, que pode ser biomassa microbiana seca ou hidratada (ou seja, a biomassa que não tenha sido seca ou que contém umidade significativa, ou seja, mais do que 6% em peso, incluindo a biomassa no caldo de fermentação que não tenha sido submetida a qualquer processo para remover ou separar a água) ou matéria-prima condicionada antes da etapa de prensagem. Em várias modalidades, o agente de volume tem um tamanho médio de partícula de menos de 1,5 mm. Em várias modalidades, o agente de volume é selecionado do grupo que consiste em celulose, forragem de milho, alecrim seco, casca de soja, biomassa gasta (biomassa de teor de lipídios reduzido em relação à biomassa da qual foi preparada), bagaço de cana e painço amarelo. Em várias modalidades, o agente de volume é biomassa gasta que contém entre 50% e 80% em peso de polissacarídeo e/ou menos do que 10% de óleo em peso. Em várias modalidades, o polissacarídeo na biomassa gasta usado como um agente de volume contém 20 a 30 por cento em mole de galactose, 55 a 65 por cento em mole de glicose e/ou 5 a 15 por cento em mole de manose.

[0015] A invenção fornece vários métodos relativos à extração de óleo de biomassa microbiana que empregam os agentes de volume descritos acima. Em um método, a biomassa microbiana hidratada apropriada para extração de óleo é preparada pela adição de um agente de volume à biomassa e secagem da mistura obtida, assim, para um teor de umidade de menos que 6%, em peso, formando uma mistura de agente de volume/biomassa seca. Em outro método, o óleo é extraído da biomassa microbiana por cossecagem da biomassa microbiana hidratada contendo pelo menos 20% de óleo em peso e um agente de volume para formar uma mistura de agente de volume/biomassa seca;

reduzir o teor de umidade na mistura para menos de 4% em peso; e prensar a mistura de teor de umidade reduzido para extrair o óleo da mesma, formando, assim, a biomassa gasta de teor de lipídios reduzido. Em outro método, os rendimentos aumentados de óleo são obtidos da biomassa microbiana contendo pelo menos 20% de lipídios em peso e por cossecagem da biomassa microbiana com um agente de volume, porque a mistura cosseca irá, após a prensagem, liberar mais óleo do que pode ser obtido da biomassa sob as mesmas condições, na ausência de um agente de volume. Em várias modalidades deste e de outros métodos da invenção, a biomassa microbiana hidratada está contida no caldo de fermentação que não foi submetido a processos para separar ou remover água a partir da biomassa antes da adição do agente de volume à biomassa. Tipicamente, a mistura do agente de volume e biomassa é condicionada por aquecimento a uma temperatura na faixa de 71,1°C a 148,9°C (160°F a 300°F), imediatamente antes da etapa de prensagem.

[0016] Em várias modalidades dos diferentes aspectos da invenção, a biomassa microbiana seca, a biomassa microbiana hidratada misturada com um agente de volume, ou matérias-primas condicionadas, opcionalmente compreendendo um agente de volume, são submetidas à pressão em uma etapa de prensagem para extrair óleo, produzindo óleo separado da biomassa gasta. A etapa de prensagem envolve submeter a pressão suficiente para extrair o óleo da matéria-prima condicionada. A lise celular irá ocorrer durante esta etapa, se a biomassa ou matéria-prima não tiver sido submetida a condições que lisem algumas ou todas as células antes da etapa de prensagem. Em várias modalidades dos diferentes aspectos da invenção, a etapa de prensagem envolverá submeter a matéria-prima condicionada a pelo menos 10.000 psi de pressão. Em várias modalidades, a etapa de prensagem envolve a aplicação de pressão

por um primeiro período de tempo, uma redução na pressão por um segundo período de tempo e, então, a aplicação de uma pressão maior do que durante o primeiro período de tempo por um terceiro período de tempo. Este processo pode ser repetido uma ou mais vezes ("pressão oscilante"). Em várias modalidades, mais do que 5 ciclos de pressão oscilante são aplicados. Em várias modalidades, um ou mais dos ciclos subsequentes podem exercer uma pressão média que é maior do que a pressão média exercida em um ou mais ciclos anteriores. Por exemplo, e sem limitação, a pressão média no último ciclo pode ser pelo menos 2 vezes maior do que a pressão média no primeiro ou qualquer ciclo anterior. Em várias modalidades, o teor de umidade da matéria-prima condicionada é controlado durante a etapa de prensagem. Em várias modalidades, a umidade é controlada em uma faixa de 0,1% a 3% em peso.

[0017] Em várias modalidades, a etapa de prensagem é conduzida com uma prensa expelidora. Em várias modalidades, a etapa de prensagem é conduzida em um modo de fluxo contínuo. Em várias modalidades, a taxa de lubrificação é de pelo menos 500 g/min. a não mais de 1000 g/min. Em várias modalidades de fluxo contínuo, a prensa expelidora é um dispositivo que compreende um eixo sem-fim continuamente em rotação dentro de uma gaiola com um alimentador em uma extremidade e um estrangulamento na extremidade oposta, contendo aberturas dentro da gaiola é usado. A matéria-prima condicionada entra na gaiola através do alimentador e a rotação do eixo sem-fim empurra a matéria-prima ao longo da gaiola e aplica pressão à matéria-prima disposta entre a gaiola e o estrangulador, a pressão liberando óleo através das aberturas da gaiola e extrusando a biomassa gasta pela extremidade estranguladora da gaiola. Em várias modalidades, a gaiola tem um comprimento interno que está entre, pelo menos, dez vezes a pelo menos vinte vezes o seu diâmetro interno. Em

várias modalidades, a gaiola compreende uma pluralidade de barras alongadas com pelo menos algumas das barras alongadas separadas por um ou mais espaçadores, as barras repousando em uma estrutura, onde um ou mais espaçadores entre as barras formam as aberturas, e o óleo é liberado através das aberturas para um vaso de coleta fluidamente acoplado com a gaiola. Em várias modalidades, os espaçadores entre as barras alongadas são de diferentes espessuras permitindo assim a variação do espaço entre cada barra alongada. Em várias modalidades, tanto os espaçadores quanto as folgas entre as barras possuem 0,012 a 0,076 cm (0,005 a 0,030 polegadas) de espessura.

[0018] Em várias modalidades, a pressão aumenta por um fator de entre 10 e 20 a partir do final do alimentador até a extremidade estranguladora da gaiola. Em várias modalidades, a pressão ao longo da gaiola não aumenta em mais do que 100% da pressão na extremidade alimentadora da gaiola por pé linear da gaiola entre as extremidades alimentadora e estranguladora da gaiola. Em várias modalidades, a energia consumida pelo dispositivo não aumenta em mais do que 10% quando totalmente carregado com matéria-prima condicionada em relação ao mesmo vazio. Em várias modalidades, o tempo de permanência de matéria-prima no tambor do dispositivo não é mais do que 50 a 10 min. Em várias modalidades, a temperatura do dispositivo expelidora ou a pressão exercida pelo dispositivo expelidora ou ambas são monitoradas e/ou controladas.

[0019] Em várias modalidades, a pressão é controlada pelo ajuste da velocidade de rotação de um eixo sem-fim. Em várias modalidades, incluindo aquelas em que a pressão não é controlada, uma prensa (rosca) expelidora, compreendendo um eixo sem-fim e um tambor, pode ser usada. Em várias modalidades, o tambor tem um comprimento e um canal com um diâmetro dimensionado para receber o eixo sem-fim, e

onde o comprimento do tambor é de pelo menos 10 a 15 vezes maior que o diâmetro do canal. Em várias modalidades, o tambor da prensa tem uma entrada e uma saída e o diâmetro do eixo sem-fim aumenta da entrada até a saída, e a prensagem compreende aumentar a pressão da entrada até a saída do tambor; em várias modalidades, a pressão na saída é de 12 a 16, ou mesmo até 20 vezes maior que a pressão na entrada. Em várias modalidades, a prensa expelidora compreende um eixo sem-fim e um tambor tendo um primeiro canal e um segundo canal, ambos os canais concêntricos e dimensionados para receber o eixo sem-fim, onde o primeiro canal tem um primeiro diâmetro e o segundo canal tem um segundo diâmetro diferente do primeiro diâmetro. Em várias modalidades, a matéria-prima condicionada permanece residente no tambor da prensa expelidora por 5 a 10 minutos.

[0020] Em várias modalidades, a prensa expelidora compreende um eixo sem-fim disposto em um tambor revestido com uma pluralidade de barras alongadas separadas por um ou mais espaçadores entre as mesmas, os espaçadores criando uma folga entre as barras alongadas. Na dita prensa, a pressão pode ser controlada ajustando o espaço, alterando o tamanho ou número de espaçadores entre as barras alongadas, e/ou se a prensa tem um espaço entre uma superfície externa do eixo sem-fim e uma superfície interna das barras alongadas, a pressão pode ser controlada substituindo pelo menos algumas das barras alongadas com barras de tamanho diferente, de modo a alterar o espaço. Em várias modalidades, a prensa compreende uma abertura de saída e um estrangulador ajustável acoplado à mesma, e a pressão é controlada ajustando o estrangulador para aumentar ou diminuir a pressão. Em várias modalidades, a prensa compreende um eixo sem-fim disposto em um tambor e a pressão é controlada ajustando um intervalo entre uma superfície externa do eixo sem-fim e uma superfície interior do tambor.

[0021] Após a etapa de prensagem, o método resulta na extração de óleo e na produção de biomassa gasta. Em várias modalidades, o óleo liberado contém partículas sólidas de biomassa ou matérias-primas condicionadas, e o método inclui ainda separar o óleo liberado das partículas sólidas. Opcionalmente, as partículas sólidas separadas podem ser submetidas a pressão para extrair qualquer óleo restante das mesmas. Em várias modalidades, o óleo extraído contém não mais de 8 ppm de cloreto, não mais de 2 ppm de fósforo, não mais que 26 ppm de potássio, não mais que 12 ppm de sódio e/ou não mais de 5 ppm de enxofre. O óleo produzido pelo processo é útil em uma variedade de aplicações, incluindo, entre outras, a produção de combustíveis como biodiesel e diesel renováveis e a produção de alimentos.

[0022] Em várias modalidades, o teor de óleo na biomassa gasta do teor reduzido de óleo é de pelo menos 45 por cento menos do que o teor de óleo da biomassa microbiana antes da etapa de prensagem. Em várias modalidades, a biomassa gasta do teor de óleo reduzido remanescente após a etapa de prensagem é peletizada ou extrusada como uma torta. A biomassa gasta, que pode ser submetida a processos adicionais, incluindo métodos adicionais de condicionamento e prensagem ou outros métodos de extração ou a base de solventes para extrair o óleo residual, é igualmente útil em uma variedade de aplicações, incluindo, mas não se limitando a, uso como alimento, principalmente para animais, e como um agente de volume. Em várias modalidades, o restante do óleo é extraído da biomassa gasta de teor de óleo reduzido; em várias modalidades a extração é realizada submetendo a biomassa gasta à pressão ou extraíndo o óleo com um solvente orgânico.

[0023] Em vista do exposto, a presente invenção é dirigida, em um aspecto, a um método para extração de lipídios de biomassa microbiana. Em uma modalidade, o método compreende submeter

biomassa microbiana que constitui pelo menos 20% de lipídios em peso e com um teor de umidade de menos que 6% em peso à pressão, pelo qual as células da biomassa são lisadas, liberando mais de 5% dos lipídios e deixando a biomassa gasta de teor de lipídios reduzido, onde os lipídios extraídos e a biomassa gasta são separados um do outro.

[0024] Em alguns casos, a biomassa microbiana é submetida a uma pressão menor por um primeiro período de tempo seguido por uma maior pressão por um segundo período de tempo. Em alguns casos, a biomassa microbiana é submetida a mais de 5 ciclos de pressão oscilante e a pressão média exercida sobre a biomassa durante o curso do último ciclo é de pelo menos duas vezes maior do que a pressão média exercida na biomassa durante o curso do primeiro ciclo. Em alguns casos, a biomassa microbiana é submetida a pressão por um método que compreende o fluxo contínuo através de um dispositivo que aplica pressão. Em uma modalidade, o dispositivo é uma prensa expelidora. Em alguns casos, a biomassa microbiana é submetida a pelo menos 69 Mpa (10,000 PSI) de pressão.

[0025] Em algumas modalidades, a biomassa microbiana é submetida à pressão por um método que compreende o fluxo contínuo através de um dispositivo que aplica pressão, onde o dispositivo é um eixo sem-fim continuamente rotativo dentro de uma gaiola com um alimentador em uma extremidade e um estrangulador na extremidade oposta do mesmo, e tendo aberturas dentro da gaiola, onde a biomassa entra na gaiola através do alimentador, e a rotação do eixo sem-fim empurra a biomassa ao longo da gaiola e aplica pressão à biomassa disposta entre a gaiola e estrangulador, a pressão lisa as células da biomassa e libera o óleo através das aberturas da gaiola de modo que a biomassa gasta de teor reduzido de óleo é extrusada da extremidade estranguladora da gaiola. Em alguns casos, a gaiola compreende uma pluralidade de barras alongadas com pelo menos algumas das barras

alongadas separadas por um ou mais espaçadores, e as barras repousando em uma estrutura, onde os ditos um ou mais espaçadores entre as barras formam as aberturas e os lipídios são liberados através das aberturas para um vaso de coleta fluidamente acoplado à gaiola. Em alguns casos, os espaçadores entre as barras alongadas são de diferentes espessuras permitindo assim a variação do espaço entre cada barra alongada. Em algumas modalidades, ou os espaçadores ou as folgas entre as barras são de 0,012 a 0,076 cm (0,005 a 0,030 polegadas) de espessura. Em alguns casos, a pressão aumenta por um fator de entre 10 e 20 da extremidade alimentadora até a extremidade estranguladora da gaiola. Em alguns casos, o tempo de permanência da biomassa no tambor do dispositivo está entre 5 a 10 minutos. Em algumas modalidades, a gaiola tem um comprimento interno que está entre, pelo menos, dez vezes a pelo menos 20 vezes o seu diâmetro interno. Em alguns casos, a energia consumida por um dispositivo não aumenta em mais do que 10% quando totalmente carregado com biomassa microbiana em relação à mesma quando vazio. Em alguns casos, a pressão ao longo da gaiola não aumenta mais do que 100% da pressão na extremidade alimentadora da gaiola por pé linear da gaiola entre as extremidades alimentadora e estranguladora da gaiola.

[0026] Em algumas modalidades, o método inclui ainda peletizar a biomassa gasta de teor reduzido em óleo ou extrusar a biomassa gasta de teor reduzido em óleo como uma torta. Em algumas modalidades, o método compreende ainda extrair lipídios da biomassa gasta de teor reduzido em óleo. Em alguns casos, o teor de lípidos na biomassa gasta de teor reduzido em óleo é de pelo menos 45 por cento menos do que o teor de lipídios da biomassa microbiana antes de submetê-la à prensagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda extrair lipídios da biomassa gasta de teor de óleo reduzido com um solvente orgânico. Em algumas modalidades, o método inclui ainda

ajustar o teor de umidade da biomassa microbiana para entre 0,1 e 5% antes de se submeter a biomassa microbiana à pressão.

[0027] Em alguns casos, o método compreende ajustar o teor de umidade da biomassa microbiana para entre 0,5% e 3,5% em peso antes de submeter à biomassa microbiana à prensagem. Em alguns casos, o método compreende ajustar o teor de umidade da biomassa microbiana para entre 1,0% e 2,0% em peso antes de submeter a biomassa microbiana à prensagem. Em algumas modalidades, o ajuste é feito pelo condicionamento da biomassa com o calor. Em alguns casos, o condicionamento com o calor é realizado utilizando um condicionador vertical empilhado.

[0028] Em algumas modalidades, o método compreende ainda condicionar a biomassa para alterar suas propriedades físicas ou físico-químicas sem liberar mais do que 5% dos lipídios para facilitar a liberação dos lipídios em uma etapa subsequente onde a biomassa é submetida à prensagem. Em alguns casos, a etapa de condicionamento compreende o aquecimento da biomassa a 65,5 a 148,9°C (150 a 300°F). Em alguns casos, a etapa de condicionamento compreende aquecer a biomassa em 93,3 a 132,2°C (200 a 270°F). Em alguns casos, a etapa de condicionamento compreende o aquecimento da biomassa a 98,9 a 126,6°C (210 a 260°F). Em algumas modalidades, a etapa de condicionamento compreende aquecimento da biomassa, por um período de tempo entre 20 e 60 minutos. Em algumas modalidades, a etapa de condicionamento compreende submeter a biomassa a uma primeira pressão que não libera mais do que 5% dos lipídios na biomassa.

[0029] Em algumas modalidades, o método ainda compreende tratar a biomassa com um expensor ou extrusor sem liberar mais do que 5% dos lipídios na biomassa antes da etapa de submeter a biomassa à pressão suficiente para liberar mais do que 5% dos lipídios.

[0030] Em algumas modalidades, o método inclui ainda a adição de um agente de volume à biomassa microbiana para facilitar a liberação dos lipídios quando a biomassa microbiana é submetida à prensagem. Em alguns casos, o agente de volume é selecionado do grupo que consiste em painço amarelo, casca de soja, alecrim seco, forragem de milho, celulose, biomassa gasta de teor de lipídios reduzido e bagaço de cana. Em alguns casos, o agente de volume é biomassa microbiana gasta de teor de lipídios reduzido que compreende entre 40% e 90% de polissacarídeos e menos de 10% de óleo. Em alguns casos, o agente de volume é biomassa microbiana gasta de teor de lipídios reduzido que compreende entre 60% e 80% de polissacarídeos e menos do que 10% de óleo. Em alguns casos, o agente de volume é biomassa microbiana gasta da mesma cepa que a biomassa microbiana. Em algumas modalidades, o polissacarídeo é de 20 a 30 por cento em mol de galactose, 55 a 65 % em mol de glicose, e 5 a 15 por cento em mol de manose. Em alguns casos, a biomassa gasta de teor de lipídios reduzido é de microalgas do gênero *Chlorella*, *Parachlorella* ou *Prototheca*. Em algumas modalidades, o agente de volume tem um tamanho médio de partícula de menos de 1,5 mm. Em alguns casos, o agente de volume tem um tamanho médio de partícula de entre 150 a 350 microns. Em alguns casos, o agente de volume é adicionado à biomassa microbiana antes de uma etapa de desidratação da biomassa microbiana a um teor de umidade de menos que 6%.

[0031] Em algumas modalidades da presente invenção, a biomassa microbiana é microalga. Em alguns casos, a microalga é selecionada a partir das espécies listadas na tabela 1. Em alguns casos, a microalga é do gênero *Chlorella*, *Parachlorella* ou *Prototheca*. Em algumas modalidades, a microalga tem uma sequência genômica rRNA 23S com pelo menos 75%, 85% ou 95% de identidade de nucleotídeos em uma ou mais das posições SEQ ID: 1-23 ou 26-34.

[0032] Em algumas modalidades da presente invenção, a biomassa microbiana é bactéria. Em alguns casos, a bactéria é do gênero *Rhodococcus*.

[0033] Em algumas modalidades da presente invenção, a biomassa microbiana é a levedura oleaginosa. Em alguns casos, a levedura oleaginosa é selecionada das espécies listadas na tabela 2. Em alguns casos, a levedura oleaginosa é *Rhodotorula glutinis*. Em algumas modalidades, a levedura oleaginosa tem uma sequência genômica rRNA 18S e 26S com pelo menos 75%, 85%, ou 95% de identidade de nucleotídeos em uma ou mais das posições SEQ ID: 37-76. Em algumas modalidades, a biomassa microbiana é uma levedura oleaginosa do gênero *Torulaspora* ou *Yarrowia*.

[0034] Em algumas modalidades da presente invenção, a biomassa microbiana é fungo oleaginoso de não levedura. Em alguns casos, o fungo oleaginoso de não levedura é selecionado a partir das espécies listadas na tabela 3.

[0035] Em algumas modalidades, a biomassa microbiana contém pelo menos 45% de lipídios em peso de célula seca. Em alguns casos, a biomassa microbiana tem pelo menos 15% de carboidratos em peso seco. Em alguns casos, a biomassa microbiana é derivada de microalgas tendo um perfil de ácidos graxos: menos de 2% C14:0; cerca de 13 a 16% C16:0; cerca de 1 a 4% C18:0; cerca de 64 a 71% C18:1; cerca de 10 a 15% C18:2; cerca de 0,5 a 2% C18:3 e menos de 1% de comprimento de cadeia de carbono 20 ou mais longo. Em alguns casos, as microalgas têm um perfil lipídico de ácidos graxos composto de pelo menos 15% de ácidos graxos C:16, pelo menos 50% de ácidos graxos C18:1, pelo menos 7% de ácidos graxos C18:2 e menos de 3% de ácidos graxos C10:0 a C14:0. Em alguns casos, a microalga tem um perfil de ácidos graxos de: cerca de 1 a 2% C14:0; cerca de 16 a 26% C16:0; cerca de 2 a 6% C18:0; cerca de 58 a 68% C18:1; cerca de 7 a

11% C18:2. Em algumas modalidades, a microalga tem um perfil lipídico, compreendendo pelo menos 4% de C8-C14 e contém um gene exógeno que codifica uma tioesterase com uma preferência por um ou mais ácidos graxos de comprimento de cadeia de 8, 10, 12 e 14 átomos de carbono. Em alguns casos, a microalga tem um perfil lipídico compreendendo entre 10 e 40% de C8-C14. Em alguns casos, a biomassa microbiana tem um perfil lipídico 16:01 compreendendo pelo menos 10%. Em algumas modalidades, a biomassa microbiana contém pelo menos 30% de lipídios em peso. Em alguns casos, a biomassa microbiana contém pelo menos 40% de lipídios em peso. Em alguns casos, a biomassa microbiana contém pelo menos 50% de lipídios em peso. Em alguns casos, a biomassa microbiana contém entre 60 a 70% de lipídios em peso.

[0036] Em algumas modalidades, os lipídios extraídos têm menos de 0,01 miligrama de clorofila por quilograma de lipídios. Em alguns casos, os lipídios extraídos têm entre 0,2 e 0,3 micrograma de carotenóides por mililitro de lipídios.

[0037] Em algumas modalidades, a biomassa microbiana contém um gene exógeno que codifica uma sacarose invertase.

[0038] Em algumas modalidades, a biomassa microbiana foi submetida a uma etapa de secagem pneumática antes da aplicação de pressão.

[0039] Em algumas modalidades, os lipídios extraídos compreendem um ou mais dos seguintes: não mais de 8 ppm de cloreto, não mais do que 2 ppm de fósforo, não mais do que 26 ppm de potássio, não mais que 12 ppm de sódio e não mais de 5 ppm de enxofre.

[0040] Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de preparação da biomassa microbiana hidratada para extração de óleo. Em uma modalidade, o método compreende a adição de um agente de volume à biomassa, e secagem do agente de volume e da

biomassa em conjunto para um teor de umidade de menos que 6%, constituindo assim uma mistura de agente de volume seco e biomassa. Em algumas modalidades, a biomassa microbiana hidratada está contida em um caldo de fermentação que não tenha sido submetida a processos de separação ou remoção de água. Em alguns casos, o agente de volume é selecionado do grupo que consiste em de painço amarelo, casca de soja, alecrim seco, forragem de milho, celulose, biomassa gasta de teor de lipídios reduzido, e bagaço de cana. Em alguns casos, o agente de volume é biomassa gasta de teor de lipídios reduzido que compreende entre 40% e 90% de polissacarídeos e menos do que 10% de óleo.

[0041] Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método para extração de lipídios a partir da biomassa microbiana. Em uma modalidade, o método compreende (a) cossecagem da biomassa microbiana hidratada constituída de pelo menos 20% de lipídios em peso e um agente de volume, formando assim, uma mistura de biomassa e agente de volume seco, (b) condicionar a mistura de biomassa e agente de volume seco de modo que o teor de umidade seja inferior a 4% em peso, e (c) submeter a mistura de biomassa e agente de volume seco condicionada à prensagem, pelo qual as células da biomassa são lisadas, liberando mais de 5% dos lipídios e deixando a biomassa gasta de teor de lipídios reduzido. Em algumas modalidades, a biomassa microbiana hidratada está contida em um caldo de fermentação que não tenha sido submetido a processos de separação ou remoção de água. Em alguns casos, o agente de volume é selecionado do grupo que consiste em painço amarelo, casca de soja, alecrim seco, forragem de milho, celulose, biomassa gasta de teor de lipídios reduzido e bagaço de cana-de-açúcar. Em alguns casos, o agente de volume é biomassa gasta de teor de lipídios reduzido que compreende entre 40% e 90% de polissacarídeos e menos de 10% de

óleo.

[0042] Ainda em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método de aumentar o rendimento na extração de lipídios a partir de biomassa microbiana que constituem de menos 20% de lipídios em peso. Em uma modalidade, o método compreende cossecagem de biomassa microbiana a com um agente de volume, em que a quantidade de óleo extraído da biomassa microbiana co-seca e agente de volume quando submetido a pressão é maior do que sem a adição do agente de volume. Em alguns casos, a biomassa microbiana é derivada de uma cultura que era cultivada através de um processo selecionado do grupo que consiste em um processo heterotrófico, um processo fotoautotrófico e um processo mixotrófico.

[0043] Estes e outros aspectos e modalidades da invenção são descritos nos desenhos em anexo, uma breve descrição dos quais imediatamente se segue, e na descrição detalhada da invenção abaixo e são exemplificados nos exemplos abaixo. Qualquer uma ou todas as características discutidas acima e em todo o pedido podem ser combinadas em diversas modalidades da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0044] A figura 1a mostra biomassa de microalgas após ter sido removida a umidade através de secagem em tambor.

[0045] A figura 1b mostra biomassa de microalgas após ser condicionada usando uma "pré-prensa" a baixa pressão para formar pinças.

[0046] A figura 2a mostra a torta prensada gasta da biomassa microbiana que é de má qualidade para a extração por solvente subsequente.

[0047] A figura 2b mostra a torta prensada da biomassa microbiana que é de boa qualidade para a extração por solvente subsequente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0048] A presente invenção fornece métodos para a extração de lipídios a partir de micro-organismos. Esta descrição detalhada da invenção é dividida em seções para a conveniência do leitor, a começar com a seção I, que fornece definições de vários termos usados na descrição da invenção. A seção II descreve os métodos da invenção para a extração de óleo de micro-organismos, para a preparação da biomassa microbiana para extração de óleo, e para posterior processamento de biomassa gasta. A Seção III descreve os micro-organismos úteis na geração de biomassa microbiana contendo óleo e os métodos para cultura deles para produzir óleo. A Seção V fornece exemplos ilustrativos de como praticar os métodos da invenção.

I. DEFINIÇÕES

[0049] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui tem o sentido comumente entendido por especialistas na técnica a qual pertence esta invenção. As referências a seguir fornecem a um especialista na técnica a qual pertence esta invenção definições gerais de muitos dos termos usados nesta revelação: Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (2ª ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *Glossary of Genetics*, 5ª Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). Conforme usado aqui, os seguintes termos terão os significados a eles atribuídos, salvo indicação em contrário.

[0050] "Percentual de área" refere-se à área de picos observados usando métodos de detecção FAME GC/FID, nos quais cada ácido graxo na amostra é convertido em um éster metílico de ácido graxo (FAME) antes da detecção. Por exemplo, um pico separado é observado para um ácido graxo de 14 átomos de carbono sem insaturação (C14:0) em comparação com qualquer outro ácido graxo,

como C14:1. A área do pico para cada classe de FAME é diretamente proporcional à sua composição percentual na mistura e é calculado com base na soma de todos os picos presentes na amostra (ou seja, [área sob pico específicos/área total de todos os picos medidos] X 100). Quando se referir a perfil lipídico de óleos e células da invenção, "pelo menos 4% de C8 C14" significa que pelo menos 4% do total de ácidos graxos na célula ou na composição glicerolipídica extraída tem um comprimento de cadeia que inclui 8, 10, 12 ou 14 átomos de carbono.

[0051] "Axênico" refere-se a uma cultura de um organismo que esteja livre de contaminação por outros organismos vivos.

[0052] "Biomassa" refere-se ao material produzido pelo crescimento e/ou propagação de células. A biomassa pode conter células e/ou teores intracelulares, bem como material extracelular. Material extracelular inclui, entre outros, compostos secretados por uma célula.

[0053] "Biorreator" refere-se a um invólucro ou invólucro parcial em que as células, por exemplo, micro-organismos, são cultivadas, opcionalmente, em suspensão.

[0054] "Agente de volume" e "auxiliar de prensagem" são usados alternadamente neste documento e referem-se ao material que é apropriado para adicionar a matéria-prima (como a biomassa seca e/ou condicionada) para aumentar o teor de fibras da matéria-prima. Agentes de volume incluem, entre outros, painço amarelo, casca de soja, a biomassa gasta, e bagaço de cana. Agentes de volume facilitam a liberação de lipídios (óleo) a partir da biomassa, talvez aumentando a uniformidade com que a pressão possa ser aplicada às células componente da biomassa. Em alguns casos, um auxiliar de prensagem também pode atuar como um auxiliar de filtração, clarificando ou reduzindo a quantidade de pés que são extraídos com o óleo. Um exemplo de auxiliar de prensagem que também atua como um auxiliar de filtro é a celulose.

[0055] "Material celulósico" significa os produtos da digestão de celulose, incluindo a glicose, xilose, dissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e outras moléculas.

[0056] "Matéria-prima condicionada" é seca significa biomassa microbiana portadora de óleo que tenha sido fisicamente alterada de alguma forma após a secagem, normalmente sem liberar mais do que 5% do total de óleo a partir da biomassa e aquecida a uma temperatura na faixa de 71,1°C a 148,9°C (160°F a 300°F). Conforme usado neste contexto, a substância a qual "liberação" e "liberado" referem-se é o óleo. Exemplos de condicionamento incluem colocar a biomassa microbiana contendo óleo seca através de um condicionador vertical empilhado, um expansor, uma extrusora, ou um expelidora, e/ou submeter a biomassa microbiana contendo óleo e seca a descamação, rachaduras, moagem, esmagamento, aquecimento, vapor condicionado térmico, de baixa pressão, alta pressão, e outros métodos para alterar a natureza física da biomassa microbiana seca contendo óleo para maximizar a extração de óleo usando métodos de extração não-químicos ou sem solventes. As mudanças que ocorrem após submeter a biomassa microbiana contendo óleo e seca ao condicionamento incluem alterações na escala micron, como paredes celulares rompidas, bem como mudanças em escala macro, como a conversão de flocos em pelotas secas sem liberar óleo em prensagem de baixa pressão.

[0057] "Refeição deslipídica" e "biomassa microbiana deslipídica" referem-se a biomassa microbiana após o óleo (inclusive lipídico) ter sido extraído da mesma, seja através do uso de uma prensa expelidora ou extração por solvente, ou ambos.

[0058] "Dry back" refere-se ao processo de adição de torta prensada (também denominado neste documento como biomassa gasta) de volta para a extremidade alimentadora da prensa onde é misturada com a biomassa não prensada. Essencialmente, a torta

prensada está atuando como um agente de volume ou auxiliar de prensagem para o material não prensado. O óleo residual na torta prensada pode ser ainda recuperado junto com o óleo da biomassa não prensada usando este processo.

[0059] "Peso seco de célula" refere-se o peso da biomassa microbiana uma vez que toda ou substancialmente toda a água (umidade) foi removido da mesma.

[0060] "Biomassa microbiana seca" refere-se a biomassa microbiana da qual a umidade livre ou umidade superficial foi removida, geralmente de modo que a biomassa microbiana que contém menos de 10%, e geralmente menos de 6%, de umidade em peso. Em uma modalidade, a biomassa microbiana seca é derivada de microalga. Em uma modalidade, a biomassa microbiana seca é derivada a de microalga que contém pelo menos, 20% de lipídios em peso de célula seca após a secagem.

[0061] "Expansora" refere-se a uma extrusora de baixo cisalhamento que aquece, homogeneiza e/ou confere forma às sementes oleaginosas e outros materiais contendo óleo em pinças ou péletes porosos com uma densidade de volume elevada. Em uma modalidade de um processo mediado pelo expansor, vapor é injetado nas tortas/flocos oleaginosos ou material contendo óleo sob pressão, e esta mistura é estrusada através de placas para a atmosfera. As pinças se expandem quando liberadas para a atmosfera, gerando o nome expansor. Historicamente, o expansor tem sido usado para preparar pinças derivadas de sementes de planta/sementes oleaginosas para extração com solvente devido à densidade de volume mais alta das pinças após o tratamento com o expansor, o que permite mais área de superfície e eficiência aumentada na extração por solvente.

[0062] "Prensa expelidora" significa uma prensa de rosca ou expelidora contínua que é usada para extração mecânica das sementes

oleaginosas, como, entre outras, sementes de soja e colza/canola. Material cru contendo óleo (como sementes oleaginosas) é alimentado à máquina em uma extremidade e o material é submetido à fricção e alta pressão a partir da movimentação da rosca que movimento o material ao longo do eixo. O óleo é liberado e escoar através de pequenas aberturas ao longo do eixo e os sólidos (com teor reduzido de óleo) são expelidos na extremidade do eixo como uma torta prensada. Exemplos de expelidora/prensa de rosca incluem aquelas que são comercializadas por Anderson International Corp. (Cleveland, OH), Alloco (Santa Fe, Argentina), De Smet Rosedowns (Humberside, UK), The Dupps Co. (Germantown, Ohio), Grupo Tecnal (São Paulo, Brasil), Insta Pro (Des Moines, Iowa), Harburg Freudenberg (anteriormente Krupp Extraktionstechnik) (Hamburg, Alemanha), French Oil Mill Machinery Company (Piqua, OH), Maschinenfabrik Reinartz (Neuss, Alemanha), Shann Consulting (New South Wales, Austrália) and SKET (Magdeburg, Alemanha).

[0063] "Fibra" significa os carboidratos complexos de plantas e outras fontes contendo fibras como micro-organismos que não podem ser digeridas por humanos. Os carboidratos complexos encontrados na fibra podem incluir celulose, hemicelulose e lignina, dextrinas, pectinas, beta-glucanas e oligosacarídeos.

[0064] "Fonte de carbono fixa" refere-se às moléculas contendo carbono, tipicamente moléculas orgânicas, que estão presentes em temperatura e pressão ambientes na forma sólida ou líquida durante a fermentação.

[0065] "Biomassa microbiana hidratada" significa biomassa microbiana contendo pelo menos 10% de teor de umidade que está em um líquido. Em algumas modalidades, a biomassa microbiana hidratada está contida em um caldo de fermentação que não foi submetido à separação ou processos de remoção de água.

[0066] "Hidrocarboneto" refere-se a: (a) uma molécula contendo somente átomos de hidrogênio e carbono, onde os átomos de carbono são covalentemente ligados para formar uma estrutura linear, ramificada, cíclica ou parcialmente cíclica à qual os átomos de hidrogênio estão ligados; ou (b) uma molécula que primariamente contém átomos de hidrogênio e carbono que podem ser convertidos para conter somente átomos de hidrogênio e carbono por uma a quatro reações químicas. Exemplos não limitantes destes últimos incluem hidrocarbonetos contendo um átomo de oxigênio entre um átomo de carbono e um átomo de hidrogênio para formar uma molécula de álcool, bem como aldeídos contendo um átomo de oxigênio. Métodos para a redução de álcoois a hidrocarbonetos contendo somente átomos de carbono e hidrogênio são bem conhecidos. Outro exemplo de um hidrocarboneto é um éster, no qual um grupo orgânico substitui um átomo de hidrogênio (ou mais do que um) em um oxigênio ácido. A estrutura molecular dos compostos hidrocarbonetos varia desde a mais simples, na forma de metano (CH_4), que é um constituinte de gás natural, até o maior e mais complexo, como os asfaltenos encontrados em óleo cru, petróleo e betumes. Os hidrocarbonetos podem estar na forma gasosa, líquida ou sólida, ou qualquer combinação destas formas, e podem ter uma ou mais ligações duplas ou triplas entre átomos de carbono adjacentes na estrutura. Consequentemente, o termo inclui alcanos, alquenos, lipídios e parafina linear, ramificados, cíclicos ou parcialmente cíclicos. Exemplos incluem propano, butano, pentano, hexano, octano, esqualeno e carotenoides.

[0067] "Razão de carbono:hidrogênio" refere-se à razão de átomos de hidrogênio para átomos de carbono em uma molécula ou em uma base átomo-a-átomo. A razão pode ainda ser usada para referir-se ao número de átomos de carbono e átomos de hidrogênio em uma molécula de hidrocarboneto. Por exemplo, o hidrocarboneto com a

razão mais alta é o metano, CH₄ (4:1).

[0068] "Fração hidrofóbica" refere-se a uma porção, ou fração, de um material que é mais solúvel em uma fase hidrofóbica em comparação a uma fase aquosa. Uma fração hidrofóbica é substancialmente insolúvel em água e geralmente não polar.

[0069] A frase "rendimento lipídico aumentado" refere-se a um aumento na produtividade de uma cultura microbiana ao, por exemplo, aumentar o peso seco de células por litro de cultura, aumentando o percentual de lipídios nas células e/ou o percentual das células que constituem lipídio, e/ou aumentar a quantidade geral de lipídio por volume de cultura por unidade de tempo.

[0070] A frase "concentração limitante de um nutriente" refere-se à concentração de nutriente em uma cultura que limita a propagação de um organismo cultivado. Uma "concentração não limitante de um nutriente" é uma concentração que suporta a propagação máxima durante certo período de cultura. Assim, o número de células produzidas durante certo período de cultura é inferior na presença de uma concentração limitante de um nutriente que quando o nutriente é não limitante. Um nutriente é dito como estando "em excesso" em uma cultura, quando o nutriente está presente em uma concentração maior do que aquela que suporta a propagação máxima.

[0071] "Lipídio" refere-se a uma molécula lipofílica a partir de um organismo biológico. As funções biológicas de um lipídio incluem, entre outras, armazenar energia, servir como um componente estrutural de uma membrana celular, e atuar como uma molécula sinalizadora. As moléculas de lipídios são solúveis em solventes não polares (como éter e clorofórmio) e são relativamente ou completamente insolúveis em água. Moléculas de lipídios têm estas propriedades, porque consistem de cadeias relativamente longas de hidrocarboneto que são hidrofóbicas por natureza. Exemplos de lipídios incluem ácidos graxos

(saturados e insaturados); glicerídeos ou glicerolipídios (como monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, e gorduras naturais, e fosfoglicerídeos ou glicerofosfolipídios); não glicerídeos (esfingolipídios, esterol lipídios, incluindo colesterol e hormônios esteroides, lipídios prenol, incluindo terpenoides, ceras e policetídeos); e derivados de lipídios complexos (lipídios ligados a açúcares, ou glicolipídeos, e lipídios ligados a proteínas). Outros exemplos de lipídio incluem ácidos graxos livres; ésteres de ácidos graxos; esteróis; pigmentos (por exemplo, carotenoides e oxicarotenoides), fitoesteróis, ergotionina, ácido lipoico, antioxidantes incluindo beta-caroteno e tocoferol. Também incluídos na classe de lipídios estão os ácidos graxos poli-insaturados como ácido aracdônico, ácido estearidônico, colesterol, desmesterol, astaxantina, cantaxantina, e ácidos graxos n-6 e n-3 altamente insaturados como ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico, e ácido docosahexaenoico (DHA). Óleo microbiano, como usado aqui, refere-se a lipídio.

[0072] A frase "composição lipídio: solvente orgânico" refere-se a uma mistura de lipídio e solvente orgânico.

[0073] "Lisado" refere-se à membrana celular ou plasmática quebrada ou rompida e opcionalmente a parede celular de um organismo biológico ou célula, e liberação de pelo menos algum conteúdo intracelular no ambiente extracelular. "Lise" refere-se à quebra da membrana celular ou plasmática e opcionalmente a parede celular de um organismo biológico suficiente para liberar pelo menos algum conteúdo intracelular no ambiente extracelular, geralmente por mecanismos mecânicos, virais, osmóticos ou variação de temperatura que comprometem sua integridade. "Lisando" refere-se ao rompimento da membrana celular ou plasmática e opcionalmente a parede celular de um organismo biológico ou célula suficiente para liberar pelo menos algum conteúdo intracelular no ambiente extracelular.

[0074] "Microalga" refere-se a um organismo microbiano que contém um cloroplasto, e opcionalmente que é capaz de realizar fotossíntese. Microalga inclui fotoautótrofos obrigatórios, que não podem metabolizar uma fonte de carbono fixada como energia, bem como heterótrofos, que podem viver unicamente de uma fonte de carbono fixada. Microalga pode referir-se a organismos unicelulares que se separam de células irmãs rapidamente após a divisão celular, como *Chlamydomonas*, e a micróbios como as, por exemplo, *Volvox*, que é um micróbio fotossintético simples multicelular de dois tipos de células distintas. "Microalga" pode ainda referir-se à células como *Chlorella* e *Dunaliella*. "Microalga" ainda inclui outros organismos microbianos fotosintéticos que apresentam adesão célula-célula, como *Agmenellum*, *Anabaena*, e *Pyrobotrys*. "Microalga" ainda inclui micro-organismos heterotróficos obrigatórios que perderam a capacidade de realizar fotossíntese, como certas espécies de dinoflagelados e espécies do gênero *Prototheca*.

[0075] "Biomassa microbiana" refere-se à biomassa derivada de um micróbio.

[0076] "Micro-organismo" e "micróbio" são usados de forma intercambiável e referem-se à organismos microscópicos unicelulares.

[0077] "Óleo" refere-se a uma substância hidrofóbica, lipofílica, não polar contendo carbono incluindo, entre outras, óleo cru derivado geologicamente, frações destiladas de óleo cru derivado geologicamente, hidrocarbonetos, óleo vegetal, óleo algal, e lipídios microbianos.

[0078] "Levedura oleaginosa" refere-se a uma levedura que pode acumular mais do que 20% de seu peso seco celular como lipídio. Levedura oleaginosa inclui organismos como *Yarrowia lipolytica* e outras espécies de *Dikarya* sub-reino de fungos como *Rhodospiridium toruloides* (*Eukaryota*; *Fungi/Metazoa group*; *Fungi*; *Dikarya*;

Basidiomycota; *Pucciniomycotina*; *Microbotryomycetes*;
Sporidiobolales; *Rhodosporidium*); *Rhodotorula glutinis* (Eukaryota;
Fungi/Metazoa group; *Fungi*; *Dikarya*; *Basidiomycota*;
Pucciniomycotina; *Microbotryomycetes*; *Sporidiobolales*; mitosporic
Sporidiobolales; *Rhodotorula*); *Lipomyces tetrasporus* (Eukaryota;
grupo *Fungi/Metazoa*; *Fungi*; *Dikarya*; *Ascomycota*; *Saccharomyceta*;
Saccharomycotina; *Saccharomycetes*; *Saccharomycetales*;
Lipomycetaceae; *Lipomyces*); *Cryptococcus curvatus* (Eukaryota; grupo
Fungi/Metazoa; *Fungi*; *Dikarya*; *Basidiomycota*; *Agaricomycotina*;
Tremellomycetes; *Tremellales*; mitosporic *Tremellales*; *Cryptococcus*);
Trichosporon domesticum (Eukaryota; grupo *Fungi/Metazoa*; *Fungi*;
Dikarya; *Basidiomycota*; *Agaricomycotina*; *Tremellomycetes*;
Tremellales; mitosporic *Tremellales*; *Trichosporon*); *Yarrowia lipolytica*
(Eukaryota; grupo *Fungi/Metazoa*; *Fungi*; *Dikarya*; *Ascomycota*;
Saccharomyceta; *Saccharomycotina*; *Saccharomycetes*;
Saccharomycetales; *Dipodascaceae*; *Yarrowia*); *Sporobolomyces*
alborubescens (Eukaryota; grupo *Fungi/Metazoa*; *Fungi*; *Dikarya*;
Basidiomycota; *Pucciniomycotina*; *Microbotryomycetes*;
Sporidiobolales; mitosporic *Sporidiobolales*; *Sporobolomyces*);
Geotrichum vulgare (Eukaryota; grupo *Fungi/Metazoa*; *Fungi*; *Dikarya*;
Ascomycota; *Saccharomyceta*; *Saccharomycotina*; *Saccharomycetes*;
Saccharomycetales; *Dipodascaceae*; mitosporic *Dipodascaceae*;
Geotrichum); e *Torulaspora delbrueckii* (Eukaryota; grupo
Fungi/Metazoa; *Fungi*; *Dikarya*; *Ascomycota*; *Saccharomyceta*;
Saccharomycotina; *Saccharomycetes*; *Saccharomycetales*;
Saccharomycetaceae; *Torulaspora*). Within *Dikarya*, a invenção inclui o
uso de organismos de todos os subdomínios de *Dikarya* (*Ascomycota* e
Basidiomycota) e sub-classificações taxonômicas dentro de
Ascomycota e *Basidiomycota*.

[0079] "Solvente orgânico" refere-se a um material contendo

carbono que dissolve um soluto sólido, líquido ou gasoso resultando em uma solução.

[0080] "Fotobiorreator" refere-se a um recipiente, pelo menos parte do qual é pelo menos parcialmente transparente ou parcialmente aberto, permitindo assim que a luz passe, no qual, por exemplo, uma ou mais células de microalga são cultivadas. Fotobiorreatores podem ser fechados, como no caso de bolsa de polietileno ou frasco de Erlenmeyer, ou podem ser abertos para o ambiente, como no caso de um reservatório externo.

[0081] "Polissacarídeo" (também chamado "glicano") refere-se a um carboidrato feito de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. A celulose é um exemplo de um polissacarídeo que constitui certas paredes celulares de plantas. A celulose pode ser despolimerizada por enzimas para gerar monossacarídeos como xilose e glicose, bem como dissacarídeos e oligossacarídeos maiores. Outros exemplos de polissacarídeos incluem fibra, fibra alimentar solúvel e insolúvel, hemicelulose, e o carboidrato de paredes celulares microbianas, como a contida na biomassa gasta.

[0082] "Enzima que degrada polissacarídeo" refere-se a qualquer enzima capaz de catalisar a hidrólise, ou despolimerização de qualquer polissacarídeo. Por exemplo, a celulose catalisa a hidrólise de celulose.

[0083] "Abertura", no contexto de um biorreator, refere-se a uma abertura no biorreator que permite a entrada ou saída de materiais como gases, líquidos e células. As portas são geralmente conectadas a tubulações a partir do fotobiorreator.

[0084] "Prensagem" refere-se à aplicação de pressão suficiente para forçar o óleo intracelular da Biomassa microbiana, que pode ainda ser referenciado neste documento como uma "etapa de prensagem." A prensagem pode ser suficiente para lisar todas ou substancialmente todas as células na Biomassa microbiana.

[0085] "Biomassa gasta", "biomassa gasta microbiana" e "torta prensada" todos se referem à Biomassa microbiana que tem tido sido feita na matéria-prima condicionada e em seguida foi submetida a alta pressão de modo que resulte em um material com menor teor de lipídios em uma base p/p do que a matéria-prima condicionada da qual é derivada. A alta pressão pode ser conseguida usando a pressão de compressão, como a fornecida por máquinas como uma prensa expelidora, um rosca expelidora de óleo, e uma prensa mecânica, bem como por pressão hidráulica direta e outros processos de modo que o óleo seja espremido da matéria-prima condicionada. Em uma modalidade, a biomassa gasta microbiana é preparada passando a Biomassa microbiana contendo óleo por uma prensa de sementes oleaginosas. Em uma modalidade, a biomassa gasta microbiana é biomassa de microalga que tem menos do que 30% de óleo por peso seco de células.

[0086] "Apropriada para alimentação animal" significa uma substância ou material que pode ser consumido sem efeitos deletérios por um animal, tipicamente um mamífero não humano de interesse da agricultura ou veterinário, incluindo, entre outros, cavalos, gado, porcos, galinhas, cães e gatos; em modalidades preferenciais, um material apropriado para alimentação animal fornece nutrição ao animal.

II. MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE MICRO-ORGANISMOS

[0087] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para extração, recuperação, isolamento ou de outra forma, obtenção de óleos (lipídios) a partir de micro-organismos. Os métodos da presente invenção são aplicáveis à extração de uma variedade de lipídios a partir de uma variedade de micro-organismos. Nos métodos da presente invenção, o micro-organismo que produzi lipídio (*por exemplo*, uma microalga) é primeiro cultivado sob condições que permitem a produção

de lipídio para gerar a biomassa microbiana contendo óleo. A biomassa contendo óleo é, em seguida, dependendo do método empregado, opcionalmente misturada com um agente de volume e secada e condicionada para preparar uma matéria-prima seca e condicionada que é então prensada para extrair o óleo. Para a conveniência do leitor, esta discussão é dividida em subseções.

[0088] A subseção descreve a biomassa microbiana apropriada para extração de óleo de acordo com os métodos da invenção. A subseção B descreve métodos para remover água da biomassa, incluindo desidratação e secagem. A subseção C descreve métodos para condicionar a biomassa. A subseção D descreve agentes de volume (auxiliares de prensagem) e seus usos com Biomassa microbiana seca, Biomassa microbiana hidratada, e matéria-prima condicionada. A subseção E descreve vários métodos para submeter uma matéria-prima condicionada à pressão para extrair óleo (a etapa de prensagem). A subseção F descreve o óleo produzido pela etapa de prensagem e métodos para seu uso e ainda a purificação. A subseção G descreve a biomassa gasta de teor reduzido de óleo produzida pela etapa de prensagem e métodos para seu uso.

A. Biomassa Apropriada

[0089] Embora a biomassa de uma ampla variedade de micróbios, incluindo microalga, bactéria oleaginosa, levedura oleaginosa e fungos (vide Seção III, abaixo), possa ser empregada nos métodos da invenção, a Biomassa microbiana apropriada para uso nos métodos descritos neste documento tipicamente compreende pelo menos 20% de óleo por peso seco de célula. Em algumas modalidades, a biomassa compreende óleo em uma faixa de pelo menos 25% a pelo menos 60% ou mais de óleo em peso seco de células. Em algumas modalidades, a biomassa contém de 15 a 90% de óleo, de 25 a 85% de óleo, de 40 a 80% de óleo, ou de 50 a 75% de óleo em peso seco de células. Em

várias modalidades da invenção, a Biomassa microbiana (seca ou hidratada) ou matéria-prima condicionada contém pelo menos 25% de óleo em peso. Em várias modalidades, a Biomassa microbiana seca ou matéria-prima condicionada contém pelo menos 25% de lipídios em peso ou em peso seco de células. Em várias modalidades, a Biomassa microbiana seca ou matéria-prima condicionada contém pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 75% de lipídios em peso ou em peso seco de células. Em várias modalidades, a Biomassa microbiana seca ou matéria-prima condicionada contém pelo menos 15% carboidrato em peso ou em peso seco de células.

[0090] O óleo da biomassa descrito neste documento, ou extraído da biomassa para uso nos métodos e composições da presente invenção pode compreender glicerolipídeos com um ou mais distintas cadeias laterais de ésteres de ácido graxo. Glicerolipídeos são compreendidos de uma molécula de glicerol esterificada com uma, duas ou três moléculas de ácido graxo, que podem ser de comprimentos variantes e terem graus variantes de saturação. As características de comprimento e saturação das moléculas de ácido graxo (e assim do óleo) podem ser manipuladas para modificar as propriedades ou proporções das moléculas de ácido graxo no óleo da presente invenção através das condições de cultura ou através da via de engenharia do lipídio, como descrito aqui (vide ainda Pedido de Patente PCT Nos. US09/066141 e US09/066142, incorporados neste documento como referência). Assim, misturas específicas de óleo algal podem ser preparadas seja dentro de espécies simples de microalga (ou outro micróbio), ou pela mistura de biomassa ou óleo algal de duas ou mais espécies de microalga (ou outro(s) micróbio(s)).

[0091] A composição do óleo, *ou seja*, as propriedades e proporções dos ácidos graxos constituintes dos glicerolipídeos pode ainda ser manipuladas pela combinação de biomassa ou óleo de pelo

menos dois gêneros ou espécies distintas de micróbios, ou seja, microalga. Em algumas modalidades, pelo menos duas das espécies ou gêneros distintos de micróbios, ou seja, microalga têm diferentes perfis de glicerolípídeo. As espécies distintas (ou gênero) de micróbios podem ser cultivadas juntas ou separadamente conforme descrito aqui (para microalga, tipicamente em condições heterotróficas), para gerar os respectivos óleos. As espécies diferentes de micróbios podem conter diferentes percentuais de ácidos graxos distintos nos glicerolípídeos da célula.

[0092] Em várias modalidades, o óleo microbiano é primariamente compreendido de óleo monoinsaturado. Em alguns casos, o óleo é pelo menos 50% óleo monoinsaturado em peso ou volume. Em várias modalidades, o óleo é pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, ou pelo menos 80% ou mais more óleo monoinsaturado em peso ou em volume. Em algumas modalidades, o óleo compreende pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, ou pelo menos 50% ou mais ácido oleico esterificado ácido alfa-linolenico em peso ou em volume. Em várias modalidades, o óleo compreende menos do que 10%, menos do que 5%, ou menos do que 1% em peso ou em volume, ou é substancialmente isento de ácido docosahexanóico esterificado (DHA).

[0093] Em várias modalidades deste e de outros aspectos da invenção, a biomassa é preparada por fermentação de um micróbio que contém ácido graxo 18:1. Em várias modalidades, o micróbio tem um perfil de ácido graxo de menos do que 1% C14:0; cerca de 10 a 11% C16:0; cerca de 3 a 4% C18:0; cerca de 70 a 71% C18:1; cerca de 14 a 15% C18:2; cerca de 1 a 2% C18:3; e menos do que 1% C20:0. Em várias modalidades, o micróbio tem um perfil de ácido graxo profile de cerca de 1 a 2% C14:0; cerca de 20% C16:0; cerca de 4% C18:0; cerca de 64% C18:1; e cerca de 7 a 8% C18:2. Em várias modalidades, o

micróbio tem no máximo 0,5% de DHA. Nestas e em outras modalidades, o micróbio é, em alguns casos, a microalga.

[0094] Assim, uma ampla variedade de biomassa microbiana é apropriada para uso nos métodos da invenção. De acordo com estes métodos, a biomassa contendo óleo é tipicamente desidratada, seca, condicionada, e em seguida pressionada a extrair o óleo.

B. Desidratação e Secagem da Biomassa microbiana

[0095] As várias modalidades dos métodos da invenção envolvem uma ou mais etapas de remoção de água (ou outros líquidos) da biomassa microbiana. Estas etapas de remoção de água podem incluir as distintas etapas referenciadas neste documento coma desidratação e secagem.

[0096] Desidratar, como usado aqui, refere-se à separação do micróbio contendo óleo a partir do caldo de fermentação (líquidos) no qual este foi cultivado. Desidratar, se realizado, deve ser realizado por um método que não resulta em, ou resulta somente em perda mínima no teor de óleo da biomassa. Consequentemente, o cuidado é geralmente tomado para evitar a lise da célula durante qualquer etapa de desagua. Desidratar é uma separação sólida-líquida e envolve a remoção de líquidos do material sólido. Processos comuns para desagua incluem centrifugação, filtração e/ou o uso de pressão mecânica.

[0097] A centrifugação é um processo que envolve o uso de força centrífuga para a separação de misturas. Os componentes mais densos da mistura migram para fora do eixo da centrífuga, enquanto os componentes menos densos da mistura migram na direção do eixo. Aumentando a força gravitacional efetiva (isto é, aumentando a velocidade de centrifugação), mais material denso, geralmente sólidos, se separam do material menos denso, geralmente líquidos, de acordo com a densidade.

[0098] Biomassa microbiana útil nos métodos da presente invenção pode ser desidratada a partir caldo de fermentação pelo uso de centrifugação, para formar uma pasta concentrada. Após a centrifugação, há ainda uma quantidade substancial de superfície ou umidade livre na Biomassa microbiana (por exemplo, acima de 70%) e assim, centrifugação não é considerada como, para fins da presente invenção, uma etapa de secagem. Opcionalmente, após a centrifugação, a biomassa pode ser lavada com uma solução de lavagem (*por exemplo*, água deionizada) para remover o caldo de fermentação e debris.

[0099] Em algumas modalidades, desidratar envolve o uso de filtração. Um exemplo de filtração que é apropriado para a presente invenção é a filtração de fluxo tangencial (TFF), também conhecida como filtração de fluxo cruzado. A filtração de fluxo tangencial é uma técnica de separação que usa os sistemas de membrana e força de fluxo para purificar sólidos de líquidos. Para um método de filtração preferencial vide Geresh, Carb. Polym. 50; 183-189 (2002), que discute o uso de tecnologias MaxCell A/G filtro de fibra de 0,45 μm de orifício. Vide ainda, por exemplo, dispositivos Millipore Pellicon[®], usados com membranas de 100kD, 300kD, 1000 kD (número de catálogo P2C01MC01), 0,1 μm (número de catálogo P2VVPPV01), 0,22 μm (número de catálogo P2GVPPV01), e 0,45 μm (número de catálogo P2HVMPV01). O retido não deve passar pelo filtro em um nível significativo. O retido também não deve aderir de forma significativa ao material do filtro. A TFF pode ainda ser realizada usando sistemas de filtração em orifícios de fibras.

[00100] Exemplos não limitantes de filtração de fluxo tangencial incluem aqueles que envolvem o uso de um filtro com um tamanho de poro de pelo menos cerca de 0,1 micrômetro, pelo menos cerca de 0,12 micrômetro, pelo menos cerca de 0,14 micrômetro, pelo menos cerca

de 0,16 micrômetro, pelo menos cerca de 0,18 micrômetro, pelo menos cerca de 0,2 micrômetro, pelo menos cerca de 0,22 micrômetro, pelo menos cerca de 0,45 micrômetro, ou pelo menos cerca de 0,65 micrômetro. Tamanhos de poro preferenciais de TFF permitem que solutos e debris no caldo de fermentação fluam, mas não células microbianas.

[00101] Em outras modalidades, desidratar envolve o uso de um mecanismo de pressão diretamente aplicada à biomassa para separar o caldo de fermentação líquido da Biomassa microbiana. A quantidade de pressão mecânica aplicada faz com que um percentual significativo de células microbianas rompa, se isto pudesse resultar na perda de óleo, mas deveria, por outro lado, ser suficiente para desidratar a biomassa ao nível desejado para o processamento subsequente.

[00102] Um exemplo não limitante de uso de pressão mecânica para desidratar Biomassa microbiana emprega o filtro prensa de esteira. Um filtro prensa de esteira é um dispositivo de desidratação que aplica pressão mecânica a uma mistura (por exemplo, Biomassa microbiana que é diretamente do fermentador ou biorreator) que é passada entre as duas esteiras tensionadas por uma serpentina de rolos de diâmetros decrescentes. O filtro prensa de esteira pode realmente ser dividido em três zonas: zona de gravidade, onde a água/líquido de drenagem livre é drenada por uma esteira porosa, onde os sólidos são preparados para aplicação de pressão; e uma zona de pressão, onde a pressão ajustável é aplicada aos sólidos drenados por gravidade.

[00103] Uma ou mais das técnicas de desidratação podem ser usadas isoladas ou em combinação para desidratar a biomassa microbiana para uso na presente invenção. A presente invenção resulta em parte da verificação de que o teor de umidade da biomassa microbiana (matéria-prima condicionada) afeta dramaticamente o rendimento do óleo obtido na etapa de prensagem, e o teor de umidade

ótimo, abaixo de 6% e preferencialmente abaixo de 2%, é um pouco diferente dos níveis de teor de umidade ótimos para prensar o óleo de muitas sementes oleaginosas. Embora o nível ótimo de umidade possa variar dependendo do tipo de semente contendo óleo, e possa ainda variar dependendo do tipo de Biomassa microbiana, o nível ótimo de umidade para prensagem de Biomassa microbiana é menos do que para sementes de óleos. Por exemplo, o teor de umidade ótimo para prensagem de gergelim e linhaça é cerca de 4% (Willems et al., J. Food Engineering 89:1, pp.8-16, 2008). O teor ótimo de umidade para prensagem de sementes de crame é entre 9,2 e 3,6% (Singh et al., JAOCS 79:2, pp.165-170, 2006). O teor ótimo de umidade para prensagem de sementes de canola é cerca de 5% (Vadke et al., JAOCS 65:7, pp.1169-1176, 1988). O teor ótimo de umidade para prensagem de coco é cerca de 11% (Mpagalile et al., Int. J. Food Sciences and Nutrition, 56:2, pp.125 – 132, 2005). Outros teores ótimos de umidades são 7% para colza, 6% para camelina, 8,5% para girassol, 11% para cártamo e 12% para soja (Alam, M.S. November 2007. Basics of Fats and Oils Chemistry: Factors Affecting Crude Oil Quality. Presented to the Vegetable Oils Extraction Short Course, Texas A&M Food Protein R&D Center, College Station, Texas).

[00104] Em contraste, o teor ótimo de umidade para prensagem de biomassa microbiana é menos do que 6% em peso, e mais preferencialmente menos do que 3%. Por exemplo, o teor ótimo de umidade pode ser 0,5 a 2% em peso. Em várias modalidades, particularmente aquelas referentes à extração de óleo de biomassa de microalga, o teor ótimo de umidade está na faixa de 0,5% a 2% do peso total da biomassa microbiana. Em uma modalidade, o teor de umidade está na faixa de 0,7% a 1,2% do peso total da biomassa microbiana. Em uma modalidade, o teor de umidade está na faixa de 1,0% a 2,0% do peso total da biomassa microbiana. O nível ótimo de umidade pode

depende de vários fatores, incluindo entre outros o percentual de lipídios (óleo) conforme medido em peso seco de células (DCW) ou a quantidade de fibra e hemicelulose na biomassa. Em algumas modalidades dos métodos da invenção, como, por exemplo, aquelas nas quais um agente de volume é empregado (vide subseção D), a desidratação isolada fornece um teor de umidade apropriado da biomassa microbiana que é então condicionada antes da etapa de prensagem. Em outros métodos e modalidades da invenção, a biomassa desidratada é submetida a uma etapa de secagem e em seguida condicionada antes da etapa de prensagem (na qual o óleo é extraído da biomassa).

[00105] Secagem, como referido neste documento, refere-se à remoção de alguma ou toda a umidade livre ou umidade de superfície da biomassa microbiana. Como a desidratação, o processo de secagem não resulta em perda significativa de óleo da biomassa microbiana. Assim, a etapa de secagem deveria tipicamente não causar lise de um número significativo das células microbianas, porque em muitos casos, os lipídios estão localizados nos compartimentos intracelulares da biomassa microbiana. Vários métodos de secagem de Biomassa microbiana conhecidos no estado da técnica para outros fins são apropriados para uso nos métodos da presente invenção. A Biomassa microbiana após remoção da umidade livre ou de superfície é referenciada aqui como Biomassa microbiana seca. Se nenhuma outra remoção de umidade ocorre no condicionamento ou ocorre redução de umidade através da adição de um agente de volume seco antes da etapa de prensagem, em seguida a Biomassa microbiana seca não deve conter menos do que 6% de umidade em peso.

[00106] Em várias modalidades, a biomassa microbiana seca tem um teor de umidade na faixa de 0,1% a 5% em peso. Em várias modalidades, a biomassa microbiana seca tem um teor de umidade de

menos do que 4% em peso. Em várias modalidades, a biomassa microbiana seca tem um teor de umidade na faixa de 0,5% a 3,5% em peso. Em várias modalidades, a biomassa microbiana seca tem um teor de umidade na faixa de 0,1% a 3% em peso. Exemplos não limitantes de métodos de secagem apropriados para uso na preparação de biomassa microbiana seca de acordo com os métodos da invenção incluem liofilização e uso de secadores como um secador de tambor, secador pulverizado e um secador em bandeja, cada um dos quais está descrito abaixo.

[00107] A liofilização, também conhecida como secagem em congelamento ou criodessecação, é um processo de desidratação que é tipicamente usado para um material perecível. O processo de liofilização envolve o congelamento do material e em seguida redução da pressão e adição de calor suficiente para permitir que a água congelada no material sublime da fase sólida para gás. No caso de liofilização da biomassa microbiana, como biomassa derivada de microalga, a parede celular da microalga atua como um crioprotetor que previne a degradação dos lipídios intracelulares durante o processo de liofilização.

[00108] Os secadores de tambor são um dos métodos mais econômicos para secagem de grandes quantidades de biomassa microbiana. Os secadores de tambor, ou secadores cilíndricos, consiste em dois grandes cilindros de aço inoxidável que giram na direção um do outro e são aquecidos a partir de dentro por vapor. Em algumas modalidades, a biomassa microbiana é aplicada à parte externa dos grandes cilindros em finas camadas. Através do aquecimento a partir do vapor, a biomassa microbiana é então seca, tipicamente in menos do que uma revolução dos grandes cilindros, e a biomassa microbiana seca resultante é raspada por fora dos cilindros por uma lâmina de aço. A biomassa microbiana seca resultante tem uma consistência escamosa.

Em várias modalidades, a biomassa microbiana é primeiro desidratada e, em seguida, seca por um secador de tambor. Uma descrição mais detalhada de um secador de tambor pode ser encontrada na Patente US 5.729.910, que divulga um tambor de secagem rotador.

[00109] A secagem por pulverização é um método comumente usado de secagem de um alimento líquido usando um gás quente. Uma secagem por pulverização toma uma corrente líquida (por exemplo, contendo a biomassa microbiana) e separa o soluto como um sólido e o líquido em um vapor. A entrada de corrente líquida é pulverizada por um bico em uma corrente de vapor quente e vaporizada. As formas sólidas como umidade rapidamente deixam as gotículas. O bico do secador por pulverização é ajustável, e tipicamente é ajustado para tornar as gotículas o menor possível para maximizar a transferência de calor e a velocidade de vaporização da água. Os sólidos secos resultantes podem ter uma consistência fina e poeirenta, dependendo do tamanho do bico usado. Em outras modalidades, os secadores por pulverização podem usar um processo de liofilização ao invés de aquecimento em corrente para secar o material.

[00110] Os secadores em bandeja são tipicamente usados para trabalho de laboratório e operações de secagem piloto de pequena escala. Secadores em bandejas trabalham com base no aquecimento e evaporação por convecção. O caldo de fermentação contendo a biomassa microbiana pode ser seco efetivamente a partir de uma ampla variedade de concentrações celulares e uma ventilação para remover a água evaporada.

[00111] Secadores instantâneos são tipicamente usados para secagem de sólidos que foram desidratados ou inerentemente têm um baixo teor de umidade. Também conhecidos como "secadores pneumáticos", estes secadores tipicamente dispersam o material úmido em uma corrente de ar aquecido (ou gás) que o transmite por um duto

de secagem. O calor da corrente de ar (ou corrente de gás) seca o material e este é transmitido pelo duto de secagem. O produto seco é então separado usando ciclones e/ou filtros em bolsa. As temperaturas elevadas de secagem podem ser usadas com muitos produtos, porque a vaporização da umidade de superfície instantaneamente resfria o gás/ar de secagem sem aumentar de forma apreciável a temperatura do produto. Descrições mais detalhadas de secadores instantâneos e secadores pneumáticos podem ser encontradas na Patente US 4.214.375, que descreve um secador instantâneo e nas Patentes US 3.789.513 e 4.101,264, que descreve um secador pneumático.

[00112] Independente do método selecionado para uma etapa de secagem, o objetivo da etapa de secagem é reduzir o teor de umidade na biomassa microbiana. Se a umidade não é removida da Biomassa microbiana seca durante a etapa de condicionamento ou reduzida pela adição de um agente de volume seco, então o teor de umidade deveria ser menos do que 6% em peso. Tipicamente, a Biomassa microbiana seca (matéria-prima condicionada) apropriada para prensagem tem um teor de umidade de cerca de 0,1% a 6% em peso, incluindo em várias modalidades, um teor de umidade de 0,5 a 2,5%. A umidade pode ser adicionada de volta à biomassa, se necessário, após a secagem para ajustar o teor de umidade para o nível ótimo. Se a biomassa microbiana seca será misturada com um agente de volume seco (vide subseção D) ou condicionada de maneira que reduzirá mais ainda o teor de umidade (vide subseção C), então um (acima 6% em peso) teor de umidade maior pode ser aceitável, os agentes de volume e/ou condicionamento podem, em algumas modalidades, reduzir o teor de umidade ao nível ótimo desejado.

[00113] A biomassa microbiana desidratada e/ou seca é condicionada antes da etapa de prensagem, conforme descrito na seguinte subseção.

C. Condicionamento da biomassa microbiana

[00114] Condicionamento da biomassa microbiana ajuda a alcançar os níveis desejados de extração de óleo. O condicionamento refere-se ao aquecimento da biomassa a uma temperatura na faixa de 71,1°C a 148,9°C (160°F a 300°F) e alteração da natureza física ou físico-química da biomassa microbiana para melhorar os rendimentos do óleo na etapa extração subsequente do óleo (prensagem). O condicionamento da biomassa microbiana resulta na produção de "matéria-prima condicionada." Adicionalmente ao calor ou "cozimento" da biomassa, exemplos não limitantes de condicionamento da biomassa incluem ajustar o teor de umidade na biomassa microbiana seca, submeter a biomassa microbiana seca a uma "pré-prensagem" de baixa pressão, submeter a biomassa microbiana a ciclos de aquecimento e resfriamento, submeter a biomassa microbiana seca a um expensor, e/ou ajuste do tamanho de partícula da biomassa microbiana seca.

[00115] A etapa de condicionamento pode incluir técnicas (por exemplo, aplicação de calor ou pressão) que se sobrepõe em parte com as técnicas usadas nas etapas de secagem e prensagem. No entanto, os objetivos primários destas etapas são diferentes: o objetivo primário da etapa de secagem é a remoção de alguma ou toda a umidade livre ou umidade de superfície da biomassa microbiana. O objetivo primário da etapa de condicionamento é aquecer a biomassa, que pode opcionalmente resultar na remoção da água intracelular de, ou seja, ajustar o teor de umidade intracelular de, a biomassa microbiana e/ou alterar a natureza física ou físico-química da biomassa microbiana sem liberação substancial de lipídios para facilitar a liberação de óleo durante a etapa de prensagem. O objetivo primário da etapa de prensagem é liberar óleo da biomassa microbiana ou matéria-prima condicionada, ou seja, a extração do óleo.

[00116] Em várias modalidades, o condicionamento envolve alterar

ou ajustar o teor de umidade da biomassa microbiana pela aplicação de calor, ou seja, condicionamento de calor. O condicionamento de calor, como usado aqui, refere-se ao tratamento de calor (direto ou indireto) da Biomassa microbiana. O teor de umidade da biomassa microbiana pode ser ajustado pelo condicionamento usando calor (direto ou indireto), que é tipicamente feito, se todo, após a etapa de secagem. Muito embora a biomassa possa ser seca por qualquer um dos métodos descritos acima, o teor de umidade da biomassa microbiana após secagem pode variar, por exemplo, de 3% a 15% de umidade em peso, ou 5-10% de umidade em peso. Tal faixa de umidade pode não ser ótima para a máxima recuperação de óleo na etapa de prensagem. Portanto, pode haver benefício na desidratação por condicionamento de calor e/ou Biomassa microbiana seca para ajustar o nível de umidade a um nível (abaixo de 6%) ótimo para uma recuperação máxima de óleo.

[00117] Os condicionadores de calor usados no processamento de sementes de óleo são apropriados para uso em condicionamento de biomassa microbiana de acordo com os métodos da presente invenção, tal como condicionadores empilhados verticais. Estes consistem em uma série de três a sete ou mais tinas de aço cilíndricas fechadas e sobrepostas. Cada tina é independentemente revestida para aquecimento a vapor em ambos os lados e no fundo e é equipada com um agitador tipo varredor montado próximo ao fundo e operado por um eixo comum que se estende pela série completa de tinas. A temperatura do condicionador de calor é ainda ajustável por regulação do aquecimento a vapor. Há uma porta automaticamente operada no fundo de cada tina, exceto para a última, para descarregar o conteúdo da tina por baixo. A tina de cima é fornecida com jatos pulverizadores para adição da umidade desejada. Embora a umidade seja pulverizada nas sementes em muitos processos de extração de óleo na agricultura durante condicionamento, este processo comum não é desejável para

o condicionamento da biomassa microbiana. Cozedores ainda têm tipicamente um tubo de exaustão e ventilador para remoção de umidade. Assim, é possível controlar a umidade da biomassa microbiana, não somente em relação ao teor final de umidade, mas ainda em cada estágio da operação. Em relação a isto, uma etapa de condicionamento de aquecimento da biomassa microbiana por um período estendido de tempo (10 a 60 minutos, por exemplo) fornece o efeito não somente da redução e aumento da temperatura da biomassa, mas ainda altera a natureza biofísica da biomassa microbiana além dos efeitos do aquecimento que podem ocorrer em uma etapa subsequente de prensagem, ou seja, simplesmente da fricção do material conforme este é forçado, por exemplo, pela prensa.

[00118] Adicionalmente, um cozedor horizontal com vapor encamisado é outro tipo de condicionador de calor que é apropriado para uso de acordo com os métodos da invenção aqui. Neste projeto, a biomassa é misturada, aquecida e transportada em um plano horizontal em leitos mais profundos quando comparado com cozedores empilhados verticais convencionais. No cozedor horizontal, a ação de uma verruma especificamente projetada mistura transportes da biomassa, enquanto a biomassa é simultaneamente aquecida com vapor indireto a partir da jaqueta de vapor. Água e vapor e ar são ventilados para fora do cozedor por um duto superior, que pode ser ou não um exaustor dependendo da capacidade do cozedor. Para cozinhar a biomassa em uma velocidade de alto fluxo, vários cozedores horizontais podem ser empilhados juntos. Nesta configuração, a biomassa é alimentada na parte superior do cozedor e aquecida e transportada por uma verruma e em seguida arremessada por gravidade em um cozedor de nível inferior onde o processo é repetido. Vários níveis de cozedores horizontais podem ser empilhados juntos dependendo da taxa de fluxo necessária e do tempo/temperatura de

condicionamento requeridos. A umidade e temperatura podem ser monitoradas e ajustadas independentemente para cada nível de cozedor horizontal.

[00119] Para o condicionamento por calor da biomassa microbiana, especialmente biomassa de microalga, o tempo e temperatura ótimos que a biomassa gasta em um condicionador vertical empilhado pode variar dependendo do nível da biomassa após a secagem. Condicionamento por calor (algumas vezes denominado como "cozimento") não deve resultar em quantidades significativas de queima ou chamuscamento da biomassa microbiana durante cozimento. Dependendo do teor de umidade da biomassa microbiana antes do condicionamento por calor, ou seja, para níveis muito baixos de umidade, pode ser benéfico ou até mesmo necessário umidificar a biomassa antes do condicionamento por calor para evitar queima ou chamuscamento. Dependendo do tipo de biomassa microbiana que será alimentada por uma prensa expelidora, a temperatura ótima para o condicionamento por calor irá variar. Para alguns tipos de microalga, a temperatura ótima para condicionamento por calor está entre 93,3 a 132,2°C (200 a 270°F). Em algumas modalidades, a biomassa de microalga é condicionada por calor a 98,9 a 110,0°C (210 a 230°F). Em outras modalidades, a biomassa de microalga é condicionada por calor a 104,4 a 132,2°C (220 a 270°F). Ainda em outras modalidades, a biomassa de microalga é condicionada por calor a 115,5 a 126,6°C (240 a 260°F). Estas faixas de temperatura são, como o teor de umidade, significativamente diferentes da que é tipicamente usada em um processo de condicionamento de semente oleaginosa, uma vez que processos de semente oleaginosa tipicamente usam temperaturas mais baixas de condicionamento.

[00120] Aquecer a biomassa microbiana contendo óleo antes da prensagem pode auxiliar a liberação de óleo e/ou acesso aos

compartimentos cheios de óleo das células. A Biomassa microbiana contendo óleo contém o óleo em compartimentos feitos de componentes celulares como proteínas e fosfolipídeos. Ciclos repetitivos de aquecimento e resfriamento podem desnaturar as proteínas e alterar a estrutura química dos componentes celulares destes compartimentos de óleo e, assim, fornecem melhor acesso ao óleo durante o processo subsequente de extração. Assim, em várias modalidades da invenção, a biomassa microbiana é condicionada para preparar matéria-prima condicionada que é usada na etapa de prensagem, e a etapa de condicionamento envolve aquecimento e, opcionalmente, um ou mais ciclos de aquecimento e resfriamento.

[00121] Se nenhum outro condicionamento por calor ou outro condicionamento que altere o teor de umidade é realizado, e se nenhum agente de volume de que ira alterar o teor de umidade é adicionado, entao uma matéria-prima condicionada resultante do condicionamento por calor nao deve conter menos do que 6% de umidade em peso. Em várias modalidades, a matéria-prima condicionada tem um teor de umidade na faixa de 0,1% a 5% em peso. Em várias modalidades, a matéria-prima condicionada tem um teor de umidade de menos do que 4% em peso. Em várias modalidades, a matéria-prima condicionada tem um teor de umidade na faixa de 0,5% a 3,5% em peso. Em várias modalidades, a matéria-prima condicionada has a teor de umidade na faixa de 0,1% a 3% em peso.

[00122] Além do aquecimento da biomassa, o condicionamento pode, em algumas modalidades, envolver a aplicação de pressão à biomassa microbiana. Para distinguir este tipo de condicionamento da pressão aplicada durante a extração de óleo (a etapa de prensagem), este tipo de condicionamento é referenciado como uma "pré-prensagem." A pré-prensagem é conduzida em baixa pressão, uma pressão inferior à usada para extração de óleo na etapa de prensagem.

As prensas expeller de alta pressão comuns (parafuso) podem ser operadas em baixa pressão para esta etapa de condicionamento de pré-prensagem. A pré-prensagem da biomassa em baixa pressão pode auxiliar na quebra e abertura das células para permitir um melhor fluxo de óleo durante a prensagem subsequente de alta pressão; no entanto, a pré-prensagem não faz com que uma quantidade significativa (por exemplo, mais do que 5%) do óleo se separe da biomassa microbiana. Ainda, a fricção e calor gerados durante a pré-prensagem podem ainda auxiliar na quebra e abertura dos compartimentos de óleo nas células. A pré-prensagem da biomassa em baixa pressão ainda altera a textura e o tamanho da partícula da biomassa, porque a biomassa irá extrusar da prensa na forma de pélete. Em algumas modalidades, uma extrusora (vide discussão abaixo) é usada para conseguir o mesmo ou resultados semelhantes com uma etapa de condicionamento de pré-prensagem de baixa pressão. Em algumas modalidades, os pellets de biomassa condicionada são ainda processados para atingir um tamanho de partícula ótimo para uma prensagem subsequente de pressão completa.

[00123] Assim, outro parâmetro relevante para uma extração ótima de óleo da biomassa microbiana é o tamanho da partícula. Tipicamente, o tamanho ótimo da partícula para uma prensa expelidora de óleo (prensa de parafuso) é aproximadamente 1/16 avos de uma polegada em espessura. Os fatores que podem afetar a faixa de tamanho da partícula incluem, entre outros, o método usado para secar a biomassa microbiana e/ou a adição de agente de volume ou auxiliar de prensagem à biomassa. Se a biomassa é secada em bandeja, por exemplo, espalhada úmida sobre uma bandeja e em seguida seca em um forno, a Biomassa microbiana seca resultante pode ser quebrada em peças uniformes de tamanho ótimo da partícula para torná-la ótima para prensagem em uma prensa expelidora. O mesmo é verdade se um

agente de volume é adicionado à biomassa microbiana antes do processo de secagem. Assim, o condicionamento pode envolver uma etapa que resulta na alteração do tamanho da partícula ou média do tamanho da partícula da biomassa microbiana. Máquinas como moinho de martelo ou fragmentadoras podem ser empregadas acordo com os métodos da invenção para ajustar a espessura e tamanho da partícula da biomassa microbiana contendo óleo.

[00124] De maneira semelhante, a extração melhorada de óleo pode resultar das alterações de outras propriedades físicas da Biomassa microbiana seca. Em particular, a porosidade e/ou a densidade da biomassa microbiana pode afetar os rendimentos da extração de óleo. Em várias modalidades dos métodos da invenção, o condicionamento da biomassa para alterar sua porosidade e/ou densidade é realizado. Tipicamente usado antes da extração com hexano ou outro solvente de óleo de sementes oleaginosas, expansores e extrusores aumenta a porosidade e a densidade de volume da matéria-prima. De acordo com os métodos da presente invenção, expansores e extrusores podem ser empregados para condicionar a biomassa microbiana antes da extração de óleo e pode ou não fazer com que uma quantidade significativa de óleo se separe da biomassa microbiana. Ambos expansores e extrusores são máquinas de cisalhamento baixo que aquecem, homogeneizam, e formatam o material contendo óleo em pinças ou péletes. Expansores e extrusores trabalham de forma semelhante; ambos tendo um ajuste de serpentina/colar dentro de um eixo de modo que, conforme se move, o material dentro do eixo, pressão mecânica e a quebra por cisalhamento quebram e abrem as células. A maior diferença entre expansores e extrusores é que os expansores usam água e/ou vapor para soprar o material para a extremidade terminal do eixo. A pressão alta súbita (e variação na pressão) faz com que a umidade no material vaporize, assim "soprando" ou expandindo o

material usando a umidade interna. As extrusoras alteram o formato do material, formando pinças ou péletes. As extrusoras ainda lisam as células e vaporizam água a partir da biomassa (redução de umidade) enquanto aumentam a temperatura da biomassa (aquecimento a biomassa) por fricção mecânica que o extrusor exerce na biomassa. . Assim, extrusores e expansores podem ser usados de acordo com os métodos da invenção para condicionar a biomassa microbiana seca. O extrusor/expansor pode quebrar as células, liberando os lipídios intracelulares, e podem ainda alterar a porosidade e a densidade de volume do material. Estas alterações nas propriedades físicas da matéria-prima podem ser vantajosas na extração subsequente de óleo.

[00125] Os métodos de condicionamento descritos acima podem ser usados isolados ou em combinação de acordo com os métodos da invenção para atingir uma matéria-prima de biomassa microbiana condicionada ótima para subsequente extração de óleo. Assim, a etapa de condicionamento envolve a aplicação de calor e opcionalmente pressão à biomassa. Em várias modalidades, a etapa de condicionamento compreende aquecimento a biomassa à temperatura na faixa de 71,1°C a 148,9°C (160°F a 300°F). Em várias modalidades, o aquecimento é realizado usando o agitador vertical. Em várias modalidades, a etapa de condicionamento compreende ainda tratar a biomassa seca com um expansor ou extrusor para formar e/ou homogeneizar a biomassa.

D. Agente de volumes (Auxiliares de Prensagem)

[00126] Em várias modalidades da invenção, o agente de volume ou auxiliar de prensagem é adicionado à biomassa microbiana, que pode ser seca ou hidratada (ou seja, biomassa que não foi seca ou que contém umidade significativa, ou seja, mais do que 6% em peso, incluindo biomassa em caldo de fermentação que não foi submetido a qualquer processo de remoção ou separação de água) biomassa

microbiana ou matéria-prima condicionada, antes da etapa de prensagem. Em várias modalidades, o agente de volume tem um tamanho médio da partícula de menos do que 1,5 mm. Em algumas modalidades, o agente de volume ou auxiliar de prensagem tem um tamanho da partícula de entre 50 microns e 1,5mm. Em outras modalidades, o auxiliar de prensagem tem um tamanho da partícula de entre 150 microns e 350 microns. Em algumas modalidades, o agente de volume é um auxiliar de filtro. Em várias modalidades, o agente de volume é selecionado do grupo que consiste em celulose, forragem de milho, alecrim seco, casca de soja, biomassa gasta (biomassa de teor reduzido em lipídio em relação à biomassa da qual foi preparada), incluindo biomassa gasta microbiana, bagaço de cana-de-açúcar, e grama. Em várias modalidades, o agente de volume é biomassa gasta microbiana (vide subseção G abaixo) que contém entre 40% e 90% de polissacarídeo em peso, como celulose, hemicelulose, fibra solúvel e insolúvel, e combinações destes diferentes polissacarídeos e/ou menos do que 10% de óleo em peso. Em várias modalidades, o polissacarídeo em uma biomassa gasta microbiana usada como um agente de volume contém 20 a 30 por cento em mole de galactose, 55 a 65 por cento em mole de glicose e/ou 5 a 15 por cento em mole de manose.

[00127] Assim, a adição de um auxiliar de prensagem ou agente de volume pode ser uma vantagem em algumas modalidades da invenção. Quando há um alto teor de óleo e baixo de fibra na biomassa, alimentar a biomassa por uma prensa pode resultar em uma emulsão. Isto resulta em baixos rendimentos de óleos, porque o óleo é capturado dentro dos sólidos. Uma maneira, de acordo com os métodos da invenção de melhorar o rendimento em tais casos é adicionar polissacarídeo à biomassa na forma de um agente de volume, também conhecido como um "auxiliar de prensa" ou "auxiliar de prensagem". Agentes de volumes são tipicamente aditivos com alto teor de fibra que atuam ajustando o

teor total de fibras da biomassa microbiana para uma faixa ótima. A biomassa microbiana como microalga e como tipicamente tem muito pouco teor de fibra crua. Tipicamente, biomassa microbiana incluindo microalga biomassa tem um teor de fibra crua de menos do que 2%. A adição de aditivos de fibra de alto teor (na forma de um auxiliar de prensagem) pode ajudar o ajuste da do teor total de fibra da biomassa microbiana até uma faixa ótima para a extração de óleo usando uma prensa expelidora. O teor ótimo de fibra para uma típica semente oleaginosa pode variar de 10 a 20%. De acordo com os métodos da presente invenção, este pode ser útil para ajustar o teor de fibra da biomassa microbiana para extração ótima de óleo. A faixa de teor de fibra na biomassa pode ser a mesma ou uma faixa semelhante como o teor ótimo de fibra para uma típica semente oleaginosa, embora o teor ótimo de fibra para cada biomassa microbiana pode ser inferior ou superior do que o teor ótimo de fibra da típica semente oleaginosa. Os auxiliares de prensagem apropriados incluem, entre outros, grama, palha de arroz, polpa de beterraba, bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja, alecrim seco, celulose, forragem de milho, torta deslipidizada (prensada ou extraída com solvente) de soja, canola, semente de algodão, girassol, sementes de jatropha, pasta de madeira, resíduos de papel e semelhantes. Em algumas modalidades, a biomassa gasta microbiana de teor de lipídio reduzido de uma prensa anterior é usada como um agente de volume. Em algumas aplicações, especialmente quando o óleo que será usado em uma aplicação alimentar ou será consumido, o auxiliar de prensagem usando na mistura com a biomassa microbiana (seca ou hidratada) ou matéria-prima condicionada será selecionado para atingir os requisitos regulatórios (para uso como um gênero alimentício). Assim, agente de volumes, quando incorporados na biomassa, alteram as propriedades físico-químicas da biomassa de modo que facilite a aplicação mais uniforme da pressão às células na

biomassa.

[00128] Em alguns casos, o agente de volume pode ser adicionado à biomassa microbiana após ter sido seca, mas ainda não condicionada. Em tais casos, esta pode ser vantajosamente adicionada para misturar a biomassa microbiana seca com a quantidade desejada do auxiliar de prensagem e em seguida condicionar a biomassa microbiana e o auxiliar de prensagem juntos antes de alimentar na prensa em parafuso. Em outros casos, o auxiliar de prensagem pode ser adicionado à biomassa microbiana hidratada antes da biomassa microbiana ser submetida a qualquer processo de separação ou desidratação, secagem, ou condicionamento. Em tais casos, o auxiliar de prensagem pode ser adicionado diretamente ao caldo de fermentação contendo a biomassa microbiana antes de qualquer etapa de desidratação ou outra etapa.

[00129] A invenção fornece vários métodos relacionados à extração de óleo de biomassa microbiana que empregam o agente de volumes descrito acima. Em um método, biomassa microbiana hidratada apropriada for extração de óleo é preparada pela adição de um agente de volume à biomassa e secagem da mistura obtida assim para um teor de umidade menos do que 6% em peso, formando, assim, um agente de volume/mistura de biomassa seco. In em outro método, o óleo é extraído da biomassa microbiana por cossecagem da biomassa microbiana hidratada contendo pelo menos 20% de óleo (incluindo pelo menos 40% de óleo) em peso e um agente de volume para formar um agente de volume/mistura de biomassa seca; reduzir o teor de umidade na mistura a menos do que 4% em peso, ou seja, por secagem e/ou condicionamento; e prensar a mistura de teor reduzido de umidade para extrair o óleo do mesmo, formando assim a biomassa gasta de reduzido teor de lipídio. Em outro método, rendimentos aumentados de óleo são obtidos da biomassa microbiana contendo pelo menos 20% lipídio em

peso por cossecagem de biomassa microbiana com um agente de volume, porque a mistura cosseca irá, na prensagem, liberar mais óleo do que a obtida da biomassa sob as mesmas condições na ausência de um agente de volume. Em várias modalidades destes e outros métodos da invenção, a biomassa microbiana hidratada está contida no caldo de fermentação que não foi submetido aos processos de separação ou remoção de água da biomassa.

[00130] Em uma modalidade, o agente de volume é biomassa gasta microbiana, opcionalmente que foi processada ou moída (para mistura fácil e homogênea), que é combinado com a biomassa microbiana que não foi extraída. Em tais casos, o teor total de polissacarídeo da mistura (biomassa gasta como um auxiliar de prensagem e biomassa microbiana não extraída) de biomassa microbiana antes de esta ser alimentada na prensa expelidora entre 10% e 40% do peso total da biomassa mistura.

E. Prensagem de Massa Microbiana

[00131] Assim, de acordo com os métodos da matéria-prima condicionada da invenção, opcionalmente compreendendo um agente de volume, é submetida a pressão em uma etapa de prensagem para extrair óleo, produzindo óleo separado da biomassa gasta. A etapa de prensagem envolve submeter pressão suficiente para extrair o óleo da matéria-prima condicionada. Assim, em algumas modalidades, a matéria-prima condicionada que é pressionada na etapa de prensagem compreende óleo predominantemente ou completamente encapsulado em células da biomassa. Em outras modalidades, a biomassa compreende predominantemente células lisadas e o óleo é assim, primariamente, não encapsulado em células.

[00132] Em várias modalidades dos diferentes aspectos da invenção, a etapa de prensagem envolverá submeter a matéria-prima condicionada a pelo menos 10.000 psi de pressão. Em várias

modalidades, a etapa de prensagem envolve a aplicação de pressão por um primeiro período de tempo e, em seguida, aplicação de uma pressão mais elevada por um segundo período de tempo. Este processo pode ser repetido uma ou mais vezes ("pressão oscilante"). Em várias modalidades, mais de 5 ciclos de pressão oscilante são aplicadas. Em várias modalidades, um ou mais dos ciclos subsequentes podem exercer uma pressão média que é maior do que a pressão média exercida em um ou mais ciclos anteriores. Por exemplo, e sem limitação, a pressão média no último ciclo pode ser pelo menos 2 vezes maior do que a pressão média no primeiro ou qualquer ciclo anterior. Em várias modalidades, o teor de umidade de matéria-prima condicionada é controlado durante a etapa de prensagem. Em várias modalidades, a umidade é controlada em uma faixa de 0,1% a 3% em peso.

[00133] Em várias modalidades, a etapa de prensagem é conduzida com uma prensa expelidora. Em várias modalidades, a etapa de prensagem é conduzida em um modo de fluxo contínuo. Em várias modalidades, a taxa de lubrificação é de pelo menos 500 g/min. para não mais de 1000 g/min. Em várias modalidades de fluxo contínuo, a prensa expelidora é um dispositivo compreendendo um eixo sem-fim rotativo continuamente dentro de uma gaiola tendo um alimentador em uma extremidade e um estrangulamento na extremidade oposta, tendo aberturas de dentro da gaiola é usado. A matéria-prima condicionada entra na gaiola através do alimentador, e a rotação do eixo sem-fim avança a matéria-prima ao longo da gaiola e aplica pressão para a matéria-prima disposta entre a gaiola e o estrangulamento, liberando a pressão de óleo através das aberturas da gaiola e extrudando a biomassa gasta a partir da extremidade de estrangulamento da gaiola. Em várias modalidades, a gaiola tem um comprimento interno que está entre, pelo menos, dez vezes a pelo menos 20 vezes o seu diâmetro interno. Em várias modalidades, a gaiola compreende uma pluralidade

de barras alongadas com pelo menos algumas das barras alongadas separadas por um ou mais espaçadores, as barras repousando em uma estrutura, em que a um ou mais espaçadores entre as barras de formam das aberturas, e o óleo é liberado através das aberturas para um vaso de coleta fluidamente acoplado com a gaiola. Em várias modalidades, os espaçadores entre as barras alongadas são de diferentes espessuras permitindo assim a variação do espaço entre cada barra alongada. Em várias modalidades, tanto os espaçadores quanto as folgas entre as barras são de 0,012 a 0,076 cm (0,005 a 0,030 polegadas) de espessura.

[00134] A gaiola em alguma prensa expelidora pode ser aquecida usando vapor ou resfriada usando água, dependendo da temperatura ideal necessária para o rendimento máximo. A temperatura ideal deve ser de calor suficiente para auxiliar na pressionar, mas o calor não muito elevado a ponto de queimar a biomassa, enquanto se alimenta através da prensa. A temperatura ideal para a gaiola da prensa expelidora pode variar dependendo da biomassa microbiana que está sendo pressionada. Em algumas modalidades, para prensagem da biomassa microbiana ou de microalgas, a gaiola é preaquecida e mantida a uma temperatura entre 93,3 a 132,2°C (200 a 270°F). Em outras modalidades, a temperatura da gaiola ideal o microbio ou algumas espécies de biomassa de microalgas é entre 98,9 a 110,0°C (210 a 230°F). Em ainda outras modalidades, a temperatura da gaiola ideal para micróbios ou algumas espécies de biomassa de microalgas é entre 115,5 a 126,6°C (240 a 260°F). Estas faixas de temperatura diferem significativamente de muitos processos de prensagem de oleaginosas e, de fato, alguns processos de prensagem de oleaginosas são referidos como "prensagem a frio", devido à falta de aquecimento das sementes ou a prensa durante o processo.

[00135] Em várias modalidades, a pressão aumenta por um fator de

entre 10 e 20 a partir da extremidade do alimentador até a extremidade do estrangulador da gaiola. Em várias modalidades, a pressão ao longo da gaiola não aumenta mais de 100% da pressão na extremidade do alimentador da gaiola por pé linear da gaiola entre o alimentador e as extremidades do estrangulador da gaiola. Em várias modalidades, a energia consumida pelo dispositivo não aumenta em mais de 10% quando totalmente carregada com matéria-prima condicionada ou biomassa em relação ao funcionamento em vazio. Em várias modalidades, o tempo de residência de matéria-prima no tambor do dispositivo não é mais do que 5 a 10 min. Em várias modalidades, seja a temperatura do dispositivo ou a pressão exercida pelo dispositivo ou ambas são monitoradas e/ou controladas.

[00136] Em várias modalidades, a pressão é controlada pelo ajuste da velocidade de rotação de um eixo sem-fim. Em várias modalidades, incluindo aquelas em que a pressão não é controlada, uma prensagem (rosca) expelidora compreendendo um eixo sem-fim e um tambor pode ser usada. Em várias modalidades, o tambor tem um comprimento e um canal com um diâmetro dimensionado para receber o eixo sem-fim, e em que o comprimento do tambor é de pelo menos 10 a 15 vezes maior que o diâmetro do canal. Em várias modalidades, o tambor da prensa tem uma entrada e uma saída e o diâmetro do eixo sem-fim aumenta a partir da entrada para a saída, e a prensagem compreende o aumento da pressão a partir da entrada para a saída do tambor, em várias modalidades, a pressão na saída é de 12 a 16 ou até 20 vezes maior do que a pressão na entrada. Em várias modalidades, a prensa (rosca) expelidora compreende um eixo sem-fim e um tambor tendo um primeiro canal e um segundo canal, ambos os canais concêntricos e dimensionados para receber o eixo sem-fim, em que o primeiro canal tem um primeiro diâmetro e o segundo canal tem um segundo diâmetro diferente do primeiro diâmetro. Em várias modalidades, a matéria-prima

condicionada permanece residente no tambor da prensa de rosca de 5 a 10 minutos.

[00137] Em várias modalidades, a prensagem (rosca) expelidora compreende um eixo sem-fim disposto em um tambor revestido com uma pluralidade de barras alongadas separadas por um ou mais espaçadores entre os mesmos, os espaçadores criando uma folga entre as barras alongadas. Em tal prensa, a pressão pode ser controlada ajustando a folga pela alteração do tamanho ou número de espaçadores entre as barras alongadas, e/ou se a prensa tem um espaço entre uma superfície externa do eixo sem-fim e uma superfície interna das barras alongadas, a pressão pode ser controlada pela substituição de, pelo menos, algumas das barras alongadas com diferentes barras dimensionadas, de modo a alterar o espaço. Em várias modalidades, a prensa compreende uma abertura de saída e um estrangulador ajustável acoplado com elas, e a pressão é controlada ajustando o estrangulador para aumentar ou diminuir a pressão. Em várias modalidades, a prensa (rosca) expelidora compreende um eixo sem-fim disposto em um tambor, e a pressão é controlada pelo ajuste de uma folga entre uma superfície externa do eixo sem-fim e uma superfície interna do tambor.

[00138] As prensas expelidoras (prensas de rosca) são rotineiramente usadas para a extração mecânica de sementes de óleo e de soja. Geralmente, as principais seções de uma prensa expelidora incluem uma entrada, uma rosca de alimentação rotativa, uma gaiola ou tambor, um eixo sem-fim e um cárter de óleo. A prensa expelidora é uma gaiola de prensa contínua em que a pressão é desenvolvida por um eixo sem-fim continuamente rotativo. Uma pressão extremamente alta, cerca de 10.000-20.000 libras por polegada quadrada, é construída na gaiola ou o tambor através da ação do trabalhando do eixo sem-fim contra um estrangulador ajustável, que contrai a descarga da torta prensada

(biomassa gasta) a partir da extremidade do tambor. Em várias modalidades, as prensas de rosca dos seguintes fabricantes são adequadas para uso: Anderson International Corp. (Cleveland, OH), Alloco (Santa Fe, Argentina), De Smet Rosedowns (Humberside, UK), The Dupps Co. (Germantown, Ohio), Grupo Tecnal (Sao Paulo, Brazil), Insta Pro (Des Moines, Iowa), French Oil Mill (Piqua, OH), Harburg Freudenberger (previously Krupp Extraktionstechnik) (Hamburg, Germany), Maschinenfabrik Reinartz (Neuss, Germany), Shann Consulting (New South Wales, Australia) e SKET (Magdeburg, Germany).

[00139] A biomassa microbiana ou matérias-primas condicionadas é fornecida para a prensa expelidora através de uma entrada. Uma rosca alimentadora rotativa avança o material fornecido a partir da entrada no tambor onde é, então, comprimido pela rotação do eixo sem-fim. O óleo extraído do material é, então, coletado em uma panela de óleo e, em seguida, bombeado para um tanque de armazenamento. A biomassa gasta é, então, extrusada fora da prensa como uma torta e podem ser coletada para processamento adicional (vide subseção G abaixo). A torta pode ser peletizada.

[00140] O eixo sem-fim é associado com uma configuração de colar e é dividido em seções. A configuração sem-fim e de colar dentro de cada seção é customizável. O eixo sem-fim é responsável pelo transporte de biomassa (matéria-prima) através da prensa. Isso pode ser caracterizado como tendo certo diâmetro e um passo de rosca. Alterando diâmetro do eixo e o passo pode-se aumentar ou diminuir a pressão e a tensão de cisalhamento aplicada à matéria-prima à medida que a mesma passa através da prensa. A finalidade do colar é para aumentar a pressão sobre a matéria-prima dentro da prensa e também aplicar uma tensão de cisalhamento para a biomassa.

[00141] A carga de prensa em termos de corrente elétrica necessária

para executar a prensa carregada com biomassa microbiana (matéria-prima condicionada) geralmente não é mais do que cerca de 10% da corrente elétrica necessária para executar a prensa vazia, e isso sugere que a energia necessária para prensar biomassa microbiana (matéria-prima condicionada divulgada neste documento é menor do que outros requisitos de energia típicos da indústria de sementes de óleo, onde a carga de prensa completa é maior do que 10% da corrente elétrica necessária para executar a prensa vazia de uma matérias-prima de semente oleaginosa).

[00142] O eixo sem-fim é preferencialmente cônico, para que seu diâmetro externo aumente ao longo do comprimento longitudinal para longe da entrada do tambor. Isso diminui a folga entre o eixo sem-fim e o interior do cilindro criando, assim, uma maior pressão e tensão de cisalhamento na medida em que a biomassa percorre pelo tambor. Além disso, o interior do tambor é composto de barras de aço planas separadas por espaçadores (também referidas como calços), que são definidos lateralmente em torno da periferia do tambor, e são mantidas no lugar por uma gaiola do tipo berço pesado. O ajustar do calço entre as barras de controla a folga entre as barras que auxiliam o óleo extraído para drenar, assim como também auxilia a regulagem da pressão cilindro. Os calços têm, muitas vezes, a partir de 0,007 cm (0,003") de espessura a 0,076 cm (0,030") de espessura e, preferencialmente, de 0,012 cm (0,005") a 0,051 cm (0,020") de espessura, embora outras espessuras também possam ser empregadas. Adicionalmente, as barras podem ser ajustadas, assim, criando seções dentro do cilindro.

[00143] Na medida em que o material de alimentação é prensado ou movido pelo tambor, calor significativo é gerado por atrito. Em alguns casos, a quantidade de calor é controlada usando um sistema de refrigeração de jaqueta de água que envolve o tambor. Devido à pressão extrema, o óleo que é prensado a partir de uma prensa de rosca

ou prensa expelidora contém uma proporção de "depósito" ou material sólido da biomassa, que flui para fora com o óleo entre as barras. O depósito pode ser rastreado, drenados e realimentados para a prensa, juntamente com a matéria-prima não prensada. Os sensores de temperatura podem ser dispostos em várias localizações ao redor do tambor para monitorar e auxiliar no controle de temperatura. Além disso, os sensores de pressão também podem ser ligados ao cano em vários locais para auxiliar a monitorar e controlar a pressão.

[00144] Várias características operacionais da prensa expelidora (rosca) podem ser expressas ou analisadas como uma taxa de compressão. A taxa de compressão é a razão do volume de material deslocado por revolução do eixo do sem-fim no início do tambor dividido pelo volume de material deslocado por revolução do eixo do sem-fim na extremidade do tambor. Por exemplo, devido ao aumentando das razões de compressão a pressão pode ser de 10 a 18 vezes maior na extremidade do tambor em comparação com o início do cilindro. Comprimento interno do tambor pode ser pelo menos dez vezes ou mesmo treze vezes o diâmetro interno do tambor. A razão de compressão típica por uma prensa expelidora ou de rosca varia de 1 a 18, dependendo do material de alimentação.

[00145] Tempo de residência da matéria-prima em uma prensagem (rosca) expelidora pode afetar a quantidade de recuperação de óleo. O tempo de residência aumentado na prensa torna a matéria-prima mais exposta à tensão de cisalhamento e pressão gerada pela prensa, que pode render maior recuperação do óleo. Tempo de residência da matéria-prima depende da velocidade com que a prensa é executada e o comprimento versus diâmetro da prensa de rosca (ou L/D). Quanto maior a razão do comprimento do eixo para o diâmetro do eixo, maior o tempo de residência da matéria-prima (quando a velocidade de rotação é mantida em uma constante). Em algumas modalidades, o tempo de

residência da biomassa de algas que está sendo pressionada com uma prensa expelidora não é mais do que 5 a 10 minutos. Este tempo de residência para a biomassa de algas é cerca do dobro do tempo de residência médio para outras sementes oleaginosas, tais como soja, canola ou semente de algodão.

[00146] Os sólidos ou tortas prensadas resultantes (biomassa gasta de teor de óleo reduzido em relação à matéria-prima fornecida à prensa de rosca) são expelidos da prensa expelidora através do cone de descarga na extremidade do cilindro/eixo. O estrangulador usa um sistema hidráulico para controlar a abertura de saída na prensa expelidora. Uma operação de prensa de óleo totalmente otimizada pode extrair a maior parte do óleo disponível no material portador de óleo. Por exemplo, as condições otimizadas para a extração de óleo de soja usando uma prensa expelidora deixa cerca de 4 a 6% de óleo residual; rendimentos semelhantes podem ser obtidos a partir da biomassa microbiana (matéria-prima condicionada), de acordo com os métodos da invenção. Uma variedade de fatores pode afetar o teor de óleo residual na torta prensada. Esses fatores incluem, mas não estão limitados a, capacidade da prensa de ruptura de células contendo óleo e compartimentos celulares e a composição do material portador de óleo em si, que pode ter uma afinidade com o óleo expelido. Em alguns casos, o material portador de óleo pode ter uma elevada afinidade para o óleo expelido e pode absorver o óleo expelido de volta para o material, assim capturando-o. Nesse caso, o óleo restante na biomassa gasta pode ser reprensado ou submetido à extração por solvente, como descrito neste documento, para recuperar o óleo.

[00147] Não é necessário o uso de agentes biológicos para extrair óleo usando uma prensa expelidora, ou seja: os agentes, tais como as enzimas que são produzidas de forma independente da biomassa microbiana. A pressão exercida sobre a biomassa condicionada é o

mecanismo principal pelo qual o óleo é liberado das vesículas de óleo na biomassa microbiana.

F. Óleo Microbiano Produzido

[00148] Após a etapa de prensagem, o método da invenção resulta da extração de óleo e, conseqüentemente, da produção de óleo extraído e biomassa gasta de teor de óleo reduzido em relação à matéria-prima condicionada fornecida na etapa de prensagem. Em outras modalidades, o óleo liberado contém partículas sólidas de biomassa (matéria-prima condicionada), e o método inclui ainda separar o óleo liberado das partículas sólidas.

[00149] Os contaminantes podem estar presentes no óleo após a prensagem (ou extração por solvente, vide subseção G abaixo, ou ambos). Em algumas modalidades, pode ser vantajoso remover esses contaminantes antes do uso posterior do óleo (tanto para aplicações em alimentos ou em reações químicas posteriores, como na produção de combustíveis). Partículas finas ou pequenas a partir da biomassa podem estar presentes no óleo extraído. Normalmente, as partículas finas são removidas através da passagem de óleo por um filtro ou outro processo que separa fisicamente as partículas de óleo. Em alternativa, as partículas sólidas separadas podem ser submetidas a pressão ou extração por solvente para extrair qualquer óleo restante.

[00150] Degomagem é outro processo adequado para uso nos métodos da invenção que remove os contaminantes, tais como fosfolípidos do óleo. Em algumas modalidades da invenção, a degomagem do óleo extraído é combinada com refino, branqueamento e desodorização (ou RBD). O processo de RBD elimina ou reduz o odor, cor e/ou sabor do óleo extraído. O processo de refino geralmente consiste em duas etapas, degomagem e uma etapa de neutralização que remove os ácidos graxos livres (FFA) no óleo através de estripagem cáustica com hidróxido de sódio. A etapa de branqueamento consiste

em misturar o óleo com várias argilas de branqueamento para absorver cor, oligometais e compostos de enxofre. A etapa de desodorização é um processo de destilação que ocorre a baixa pressão e alta temperatura. O óleo é colocado sob vácuo e aquecido com vapor para remover todos os gostos ou odores de FFAs. A desodorização também pode ser alcançada pelo tratamento com carvão ativado.

[00151] Outros métodos de remoção de contaminantes como metais pesados envolvem refino de álcalis, pré-tratamento ácido e uso de argilas ativadas ou zeólitas pode também ser empregado em outras modalidades da invenção. O óleo é misturado a temperaturas moderadas com pequenas quantidades de alguns hidróxidos de amônia ou alcalinos e sais alcalinos ou de amônio na presença de um catalisador de transferência de fase. A tecnologia de PROP, desenvolvido pela Phillips Petroleum Company, combina desmetalização química e hidrogenação para remover os contaminantes do óleo. O processo envolve a mistura do óleo com uma solução aquosa de fosfato de diamônio a uma temperatura elevada, a fim de reduzir o teor de metal do óleo. Este processo leva a reações químicas que formam fosfatos metálicos, que podem ser removidos do óleo por filtração. Em seguida, o óleo é misturado com hidrogênio e percolados de leite de argila e gasta um catalisador Ni/Mo em um reator de hidrogenação. Esta etapa de adsorção remove os traços remanescentes de compostos contaminantes, como enxofre, oxigênio, cloro e nitrogênio.

[00152] Em outras modalidades, o óleo extraído produzido pelos métodos da invenção contém não mais de 8 ppm de cloreto, não mais de 2 ppm de fósforo, não mais que 26 ppm de potássio, não mais que 12 ppm de sódio e/ou não mais de 5 ppm de enxofre. O óleo produzido pelo processo é útil em diversas aplicações, incluindo, entre outros, produção de combustíveis como biodiesel e diesel renovável (vide , por

exemplo, Publicação PCT 2008/151149 e Pedidos PCT US09/066141 e US09/066142, cada um incorporado neste documento para referência) e a produção alimentícia (vide, por exemplo, Pedido PCT US09/060692, incorporado neste documento como referência).

G. Biomassa Gasta Produzida

[00153] Os métodos de extração de óleo da presente invenção resultam na produção de biomassa microbiana do teor de óleo reduzido (biomassa gasta também conhecida como torta prensada ou biomassa prensada) em relação à matéria-prima condicionada submetida a pressão na etapa de prensagem. Em outras modalidades da presente invenção, o teor de óleo na biomassa gasta de teor de óleo reduzido é, pelo menos, 45 por cento menor do que o teor de óleo de biomassa microbiana antes da etapa de prensagem. Em outras modalidades, a biomassa gasta de teor de óleo reduzido remanescente após a etapa de prensagem é peletizada ou extrusada como uma torta. A torta gasta, que pode ser submetida a outros processos, incluindo métodos de extração a base de solvente ou prensa e condicionamento para extrair o óleo residual de acordo com a invenção, é igualmente útil em uma série de aplicações, incluindo, entre outros, como aplicações alimentícias, particularmente para animais, e como auxílio à prensa. Em outras modalidades da invenção, o óleo remanescente é extraído da biomassa gasta de teor de óleo reduzido; em outras modalidades, a extração é realizada por meio de biomassa gasta a pressão ou por extração de óleo com solvente orgânico.

[00154] Em alguns casos, a torta prensada contém uma variação de menos de 50% a menos de 1% de óleo em peso, incluindo, por exemplo, menos de 40% de óleo em peso, menos de 20% de óleo em peso, menos de 10%, menos de 5% de óleo em peso, e menos de 2% de óleo em peso. Em todos os casos, o teor de óleo na torta prensada é menor que o teor de óleo no material não prensado.

[00155] Em algumas modalidades, a biomassa gasta ou torta pressionada é coletada e reciclada novamente na prensa com matéria-prima condicionada fresca ou biomassa seca como um auxílio de prensa de agente de volume. Neste caso, pode ser necessário condicionar a biomassa gasta antes ou depois da mistura com matéria-prima não pressionada ou biomassa para torná-la adequada como um auxílio de prensa do agente de volume. Em outras modalidades, a biomassa gasta ou torta prensada, que pode conter óleo residual e outros componentes, ou seja, fibra alimentar, é adequada para uso como alimento humano ou animal ou aditivo alimentar. Em tais aplicações, a biomassa gasta produzida pelos métodos da invenção pode ser chamada de "refeição" ou "refeição deslipidada".

[00156] Dessa forma, a biomassa gasta produzida pelos métodos da invenção é útil como alimento animal para animais de criação, por exemplo, os ruminantes, aves, suínos e de aquicultura. Esta refeição deslipidada, como descrito acima, é a biomassa microbiana de teor de óleo/lipídio reduzido e pode ser produzido através de um processo mecânico (por exemplo, prensagem) ou através de um processo de extração por solvente (vide abaixo), ou ambos. Normalmente, a refeição deslipidada tem menos de 15% de óleo em peso. Em uma modalidade preferida, a refeição deslipidada gerada a partir de prensagem (rosca) expelidora da biomassa microbiana seguida da extração por solvente, tem um teor de óleo inferior a 10% em peso. Como descrito acima, uma refeição deslipidada é adequada para uso como um agente de volume (auxílio de prensa). Além disso, a refeição deslipidada, embora com teor de óleo reduzido, ainda contém proteínas de alta qualidade, carboidratos, fibras, minerais e outros nutrientes adequados para uma alimentação animal. Já que as células são predominantemente lisadas, a refeição deslipidada é facilmente digerida. A refeição deslipidada pode ser opcionalmente combinada

com outros ingredientes, tais como grãos, em uma alimentação animal. Já que a refeição deslipidada tem uma consistência em pó, pode ser pressionada em péletes utilizando uma extrusora ou expansores, que são disponíveis comercialmente.

[00157] Como mencionado acima, a biomassa gasta, dependendo da eficiência da etapa de prensagem, pode conter quantidades significativas de óleo. Enquanto que, em outras modalidades, este óleo pode ser extraído por prensagem, em conformidade com os métodos da invenção (por exemplo, quando a biomassa gasta é usada como um agente de volume), a biomassa gasta também pode ser submetida a extração por solvente para recuperar mais óleo a partir da biomassa microbiana.

[00158] Um exemplo de extração por solvente adequado para uso em tais modalidades da invenção é extração com hexano. Nesta modalidade, depois que o óleo foi extraído por prensagem, a biomassa gasta restante é misturada com hexano para extrair o teor de óleo restante. O óleo livre na biomassa microbiana gasta forma a micela com o solvente (ex., hexano) e é separado dos sólidos (refeição com biomassa deslipidada). A miscela óleo-solvente é filtrada e o solvente é evaporado e reciclado para uso em futuras extrações de solventes. A refeição de biomassa deslipidada pode ser dessolventizada e adequada para uso em alimentação animal ou aditivo alimentar, em conformidade com os métodos da invenção.

[00159] A extração por solvente pode recuperar o óleo livre que está preso ou reabsorvido na biomassa microbiana gasta, no entanto, a extração por solvente não pode recuperar o óleo que ainda está preso em células microbianas não quebradas/não lisadas. A biomassa microbiana que foi condicionada (e lisada) em uma extrusora ou expansora, mas não submetidas à alta pressão de uma prensa de parafuso também pode ser extraída de solvente, a fim de recuperar o

óleo liberado a partir da biomassa durante a etapa de condicionamento. Já que a eficiência de extração por solvente depende da acessibilidade do solvente ao óleo livre, é importante aumentar a porosidade e/ou área de superfície do material para extração por solvente. Idealmente, para a extração por solvente, a biomassa microbiana gasta ou torta prensada deve conter uma alta porcentagem de células microbianas lisadas ou quebradas, com textura porosa e a maior área de superfície para a extração por solvente, não deve ser comprimida ou queimada e não deve ser em pó e seco. Em uma modalidade preferida, a biomassa microbiana gasta contém pelo menos 85% de células microbianas quebradas ou lisadas.

[00160] Vários tipos de extratores de solventes são usados na técnica e são adequados para uso com a biomassa gasta como descrito acima. Em uma modalidade, um extrator de solvente de percolação contínuo é usado para extrair o óleo residual livre de biomassa microbiana gasta. Outro método de extração de óleo adequado para uso em conformidade com os métodos da invenção é o método de extração por dióxido de carbono/fluido supercrítico em que o dióxido de carbono é liquefeito por pressão e aquecido até o ponto que tenha propriedades de líquido e gás. Este fluido liquefeito então age como solvente na extração de óleo a partir da biomassa microbiana gasta.

[00161] Os métodos de extração sem solventes conhecidos no estado da técnica por lipídios também podem ser usados para a recuperação de óleo a partir da biomassa gasta de acordo com os métodos da invenção. Por exemplo, os métodos descritos na Patente US 6.750.048 podem ser usados para recuperar o óleo a partir da biomassa gasta produzida pelos métodos da invenção. Outro método de extração sem solvente adequado envolve tratar a biomassa gasta com um ácido para criar uma pasta líquida. Opcionalmente, a pasta pode ser sonicada para garantir a lise completa das células de

microalgas na biomassa gasta. O lisado produzido por tratamento ácido é preferencialmente gerado em temperaturas acima da temperatura ambiente. Tal lisado, mediante centrifugação ou sedimentação por gravidade, pode ser separado em camadas, uma das quais é uma solução aquosa: camada lipídica. Outras camadas podem incluir um pélete sólido, uma camada aquosa e uma camada de lipídios. Os lipídios podem ser extraídos da camada de emulsão por congelamento/descongelamento ou resfriamento da emulsão. Em tais métodos, não é necessário adicionar qualquer solvente orgânico, embora em algumas modalidades, possa ser vantajoso.

[00162] A seção a seguir descreve micro-organismos úteis para a produção de biomassa microbiana que contém óleo adequado para uso nos métodos da invenção.

III. MICRO-ORGANISMOS ÚTEIS PARA PRODUÇÃO DE ÓLEO E MÉTODOS PARA CULTIVO DOS MESMOS

[00163] A presente invenção decorreu, em parte, da verificação de que certos micro-organismos que podem ser usados para produzir óleo e composições de hidrocarbonetos derivados, economicamente e em grandes quantidades para uso no transporte de combustíveis e na indústria petroquímica, bem como outras aplicações. Micro-organismos adequados incluem microalgas, bactérias oleaginosas, levedura oleaginosa e fungos. A transesterificação ácida de lipídios produz ésteres de ácidos graxos de cadeia longa úteis como biodiesel. Outros processos enzimáticos podem ser aplicados a lipídios derivados desses organismos como descrito aqui para produzir ácidos graxos, aldeídos, álcoois e alcanos. A presente invenção também fornece métodos para o cultivo de micro-organismos como microalgas para alcançar maior produtividade de lipídios e aumento do rendimento de lipídios.

[00164] Os micro-organismos úteis na invenção produzem óleo (lipídios ou hidrocarbonetos) adequados para produção de biodiesel ou

como matéria-prima para aplicações industriais. Hidrocarbonetos adequados para a produção de biodiesel incluem triacilglicerídeos (TAG), contendo moléculas de ácidos graxos de cadeia longa. Hidrocarbonetos adequados para aplicações industriais, tais como fabricação, incluem ácidos graxos, aldeídos, álcoois e alcanos. Em algumas modalidades, os ácidos graxos adequados ou álcoois primários correspondentes, aldeídos ou alcanos, gerados pelos métodos descritos neste documento, contém, pelo menos, de 8 a 35 átomos de carbono. Os ácidos graxos de cadeia longa para biodiesel geralmente contêm pelo menos 14 átomos de carbono ou mais.

[00165] Os ácidos graxos preferidos ou álcoois primários correspondentes, aldeídos e alcanos para aplicações industriais contém pelo menos 8 ou mais átomos de carbono. Em algumas modalidades da invenção, os ácidos graxos acima, bem como outras moléculas de hidrocarbonetos correspondentes, são saturados (sem ligações duplas ou triplas de carbono-carbono); mono-insaturados (única ligação carbono-carbono dupla), ou poli-insaturados (duas ou mais ligações duplas carbono-carbono) e são lineares (não cíclico), e/ou têm pouca ou nenhuma ramificação em suas estruturas.

[00166] Os triacilgliceróis contendo cadeias de carbono com variação de C8 a C22 podem ser produzidos usando os métodos da invenção e são preferidos em diversas aplicações. Para os tensoativos, os TAGs preferidos são normalmente C10-C14. Para biodiesel ou diesel renovável, os TAGS preferidos são normalmente C16-C18. Para combustível de aviação, os TAGS preferidos são normalmente C8-C10. Para nutrição, os tags preferidos são ácidos graxos poliinsaturados C22 (como, DHA) e carotenóides (como astaxantina).

[00167] Qualquer espécie de organismo que produza lipídios ou hidrocarbonetos adequados pode ser usada nos métodos da invenção, apesar de serem preferidos micro-organismos que produzam

naturalmente altos níveis de lipídios ou hidrocarbonetos adequados. Produção de hidrocarbonetos por micro-organismos é revisado por Metzger *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2005) 66: 486-496 and A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann and Paul Roessler (1998), incorporado neste documento para referência.

[00168] Considerações que afetam a seleção de um micro-organismo para uso na invenção incluem, além da produção de hidrocarbonetos adequados para biodiesel ou para aplicações industriais, (1) alto teor lipídico como percentagem do peso da célula; (2) facilidade de crescimento e (3) facilidade de processamento. Em modalidades específicas, o micro-organismo produz células que pelo menos: têm cerca de 40% a 60% ou mais (incluindo mais de 70%) de lipídios quando colhidas para extração de óleo. Para algumas aplicações, os organismos que crescem heterotroficamente (em açúcar, na ausência de luz) ou podem ser desenvolvidos, são úteis nos métodos da invenção. Vide Patentes US 60/837.839, 61/118.994, 11/893.364 e 12/194.389, bem como Publicações de Pedido de Patente US 20090004715, 20090047721, 20090011480, 20090035842, 20090061493, 20090148918; Pedido PCT no. 2009/66141 e 2009/066142, e Pedido PCT No. 2008/151149, cada um aqui incorporado para referência em sua totalidade. Para aplicações em que um organismo será geneticamente modificado, a facilidade de transformação e disponibilidade de marcadores selecionáveis e promotores, constitutivos e/ou induzidos, que são funcionais no micro-organismo afetarão a seleção do organismo a ser modificado.

[00169] As microalgas de ocorrência natural são micro-organismos preferidos para uso nos métodos da invenção. Assim, em outras modalidades preferidas da presente invenção, o micro-organismo que

produz lipídio - o micro-organismo a partir do qual o óleo é extraído, recuperado, ou obtido - é uma microalga. Exemplos de gêneros e espécies de microalgas que podem ser usados nos métodos da presente invenção incluem, entre outros, os seguintes gêneros e espécies de microalgas.

Tabela 1. Microalgas.

Achnanthes orientalis, *Agmenellum*, *Amphiprora hyaline*, *Amphora coffeiformis*, *Amphora coffeiformis lineae*, *Amphora coffeiformis punctata*, *Amphora coffeiformis taylori*, *Amphora coffeiformis tenuis*, *Amphora delicatissima*, *Amphora delicatissima capitata*, *Amphora* sp., *Anabaena*, *Ankistrodesmus*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Boekelovia hooglandii*, *Borodinella* sp., *Botryococcus braunii*, *Botryococcus sudeticus*, *Bracteococcus aerius*, *Bracteococcus* sp., *Bracteococcus grandis*, *Bracteococcus cinnabarinus*, *Bracteococcus minor*, *Bracteococcus medionucleatus*, *Cténicaria*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros muelleri subsalsum*, *Chaetoceros* sp., *Chlorella anitrata*, *Chlorella Antarctica*, *Chlorella aureoviridis*, *Chlorella candida*, *Chlorella capsulate*, *Chlorella desiccata*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella fusca*, *Chlorella fusca* var. *vacuolata*, *Chlorella glucotropha*, *Chlorella infusionum*, *Chlorella infusionum* var. *actophila*, *Chlorella infusionum* var. *auxenophila*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella lobophora* (strain SAG 37.88), *Chlorella luteoviridis*, *Chlorella luteoviridis* var. *aureoviridis*, *Chlorella luteoviridis* var. *lutescens*, *Chlorella miniata*, *Chlorella* cf. *minutissima*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella mutabilis*, *Chlorella nocturna*, *Chlorella ovalis*, *Chlorella parva*, *Chlorella photophila*, *Chlorella pringsheimii*, *Chlorella protothecoides* (including any of UTEX strains 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25), *Chlorella protothecoides* var. *acidicola*, *Chlorella regularis*, *Chlorella regularis* var. *minima*, *Chlorella regularis* var. *umbricata*, *Chlorella reisiigii*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella*

saccharophila var. *ellipsoidea*, *Chlorella salina*, *Chlorella simplex*,
Chlorella sorokiniana, *Chlorella* sp., *Chlorella sphaerica*, *Chlorella*
stigmatophora, *Chlorella vanniellii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella*
vulgaris f. *tertia*, *Chlorella vulgaris* var. *autotrophica*, *Chlorella vulgaris*
var. *viridis*, *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris*, *Chlorella vulgaris* var.
vulgaris f. *tertia*, *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* f. *viridis*, *Chlorella*
xanthella, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella trebouxii*, *Chlorella*
vulgaris, *Chlorococcum infusionum*, *Chlorococcum* sp., *Chlorogonium*,
Chroomonas sp., *Chrysosphaera* sp., *Cricosphaera* sp.,
Cryptothecodinium cohnii, *Cryptomonas* sp., *Cyclotella cryptica*,
Cyclotella meneghiniana, *Cyclotella* sp., *Dunaliella* sp., *Dunaliella*
bardawil, *Dunaliella bioculata*, *Dunaliella granulate*, *Dunaliella*
maritima, *Dunaliella minuta*, *Dunaliella parva*, *Dunaliella peircei*,
Dunaliella primolecta, *Dunaliella salina*, *Dunaliella terricola*, *Dunaliella*
tertiolecta, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Eremosphaera*
viridis, *Eremosphaera* sp., *Ellipsoidon* sp., *Euglena*, *Franceia* sp.,
Fragilaria crotonensis, *Fragilaria* sp., *Gleocapsa* sp., *Gloeothamnion*
sp., *Hymenomonas* sp., *Isochrysis* aff. *galbana*, *Isochrysis galbana*,
Lepocinclis, *Micractinium*, *Micractinium* (UTEX LB 2614),
Monoraphidium minutum, *Monoraphidium* sp., *Nannochloris* sp.,
Nannochloropsis salina, *Nannochloropsis* sp., *Navicula acceptata*,
Navicula biskanterae, *Navicula pseudotenelloides*, *Navicula*
pelliculosa, *Navicula saprophila*, *Navicula* sp., *Neochloris*
oleabundans, *Nephrochloris* sp., *Nephroselmis* sp., *Nitzschia*
communis, *Nitzschia alexandrina*, *Nitzschia communis*, *Nitzschia*
dissipata, *Nitzschia frustulum*, *Nitzschia hantzschiana*, *Nitzschia*
inconspicua, *Nitzschia intermedia*, *Nitzschia microcephala*, *Nitzschia*
pusilla, *Nitzschia pusilla elliptica*, *Nitzschia pusilla monoensis*,
Nitzschia quadrangular, *Nitzschia* sp., *Ochromonas* sp., *Oocystis*
parva, *Oocystis pusilla*, *Oocystis* sp., *Oscillatoria limnetica*, *Oscillatoria*

sp., *Oscillatoria subbrevis*, *ParaChlorella beijerinckii*, *ParaChlorella kessleri*, *Pascheria acidophila*, *Pavlova sp.*, *Phagus*, *Phormidium*, *Platymonas sp.*, *Pleurochrysis cténicarae*, *Pleurochrysis dentate*, *Pleurochrysis sp.*, *Prototheca stagnora*, *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis*, *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca zopfii*, *PseudoChlorella aquatica*, *Pyramimonas sp.*, *Pyrobotrys*, *Sarcinoid chrysophyte*, *Scenedesmus armatus*, *Scenedesmus rubescens*, *Schizochytrium*, *Spirogyra*, *Spirulina platensis*, *Stichococcus sp.*, *Synechococcus sp.*, *Tetraedron*, *Tetraselmis sp.*, *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii*, e *Viridiella fridericiana*.

[00170] Em outras modalidades preferidas da presente invenção, o micro-organismo que produz um lipídio ou um micro-organismo a partir do qual o óleo pode ser extraído, recuperado, ou obtido é um organismo de uma espécie do gênero *Chlorella*. Em outras modalidades preferidas, as microalgas são *Chlorella protothecoides*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella zofinienesi*, *Chlorella luteoviridis*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella fusca var. vacuolata* *Chlorella sp.*, *Chlorella cf. minutissima* ou *Chlorella emersonii*. *Chlorella* é um gênero de algas verdes unicelulares, pertencente ao phylum Chlorophyta. É esférico na forma, aproximadamente de 2 a 10 µm de diâmetro e sem flagelados. Algumas espécies de *Chlorella* são naturalmente heterotróficas. *Chlorella*, particularmente *Chlorella protothecoides*, é um micro-organismo preferido para uso na invenção devido à sua alta composição de lipídios e sua capacidade de crescer heterotroficamente.

[00171] *Chlorella*, preferencialmente, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima* ou *Chlorella emersonii*, podem ser geneticamente modificados para expressar um ou mais genes heterólogos ("transgenes"). Exemplos de expressão de transgenes em, por exemplo, *Chlorella*, podem ser encontrados na literatura (vide , por exemplo,

Current Microbiology Vol. 35 (1997), pp. 356–362; Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2000 Jul;16(4):443-6; *Current Microbiology* Vol. 38 (1999), pp. 335–341; *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 72: 197–205; *Marine Biotechnology* 4, 63–73, 2002; *Current Genetics* 39:5, 365-370 (2001); *Plant Cell Reports* 18:9, 778-780, (1999); *Biologia Plantarum* 42(2): 209-216, (1999); *Plant Pathol. J* 21(1): 13-20, (2005)), e tais referências são incorporada neste documentos como método de ensino e materiais para introdução e expressão de genes de interesse em tais organismos, como os pedidos de patente referidos acima. Outras microalgas produtoras de lipídios podem ser modificadas, incluindo microalgas procarióticas (vide Kalscheuer et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 52, Number 4/October, 1999), que são adequadas para uso nos métodos da invenção.

[00172] Espécies de *Chlorella* adequadas para uso na invenção também podem ser identificadas por um método que envolve a amplificação de regiões alvo do genoma. Por exemplo, a identificação de uma determinada espécie ou estirpe *Chlorella* pode ser alcançada através de amplificação e sequenciamento de DNA nuclear e/ou cloroplasto usando primers e metodologia que usa qualquer região do genoma, tais como, por exemplo, os métodos descritos em Wu *et al.*, *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42:115-121 (2001). A identificação de *Chlorella* spp. isola com o uso de sequências de DNA ribossomal. Os métodos bem estabelecidos de análise filogenética, como amplificação e sequenciamento do espaçador interno transcrito ribossomal (ITS1 e ITS2 rDNA), 18S rRNA, e outras regiões genômicas conservadas podem ser usadas por aqueles versados na técnica para identificar não somente espécies de *Chlorella*, mas outros organismos que produzem lipídios e óleo capazes de usar os métodos divulgados neste documento. Para exemplos de métodos de identificação e classificação de algas vide *Genetics*, 170 (4) :1601-10 (2005) e *RNA*, 11 (4) :361-4

(2005).

[00173] Uma comparação do DNA genômico também pode ser usada para identificar as espécies adequadas de microalgas para uso nos métodos da presente invenção. As regiões de DNA conservadas, incluindo, entre outros, codificação de DNA 23S rRNA, podem ser ampliadas a partir de espécies de microalgas e comparadas com sequências de consenso para triagem de espécies de microalgas que são taxonomicamente relacionadas a microalgas preferidas para uso nos métodos da presente invenção. Comparações genômicas de DNA semelhantes também podem ser usadas para identificar as espécies adequadas de levedura oleaginosa para uso nos métodos da presente invenção. As regiões de DNA genômico conservado, tais como, entre outros, sequências genômicas conservadas entre três regiões principais de genes 18S de fungos e cinco regiões principais de genes 26S rRNA de fungos podem ser amplificadas a partir de espécies de levedura oleaginosa que pode ser, por exemplo, taxonomicamente relacionada às espécies de levedura oleaginosa usadas na presente invenção e comparadas com as regiões correspondentes das espécies preferidas. O exemplo 13 descreve o sequenciamento genômico das regiões 3' conservadas de 18S de fungos e regiões 5' de 26S rRNA 26S de fungos para 48 fitas de leveduras oleaginosas e as sequências genômicas são listados como SEQ ID NOs: 37-69.

[00174] Em algumas modalidades, a levedura oleaginosa preferida para uso nos métodos da presente invenção têm sequências de DNA genômico de codificação 18S de fungos e sequência genômica 26S rRNA com pelo menos 75%, 85% ou 95% de identidade de nucleotídeos para um ou mais SEQ ID NOs: 37-69.

[00175] Em algumas modalidades, as microalgas preferidas para uso nos métodos da presente invenção têm sequências de DNA genômico de codificação de rRNA 23S que são pelo menos 99%, ou, pelo menos,

95%, ou, pelo menos, 90%, ou pelo menos 85% idênticos a uma sequência de 23S rRNA de uma espécie *Chlorella*.

[00176] A *Prototheca* é um gênero de microalgas unicelulares que parece ser mutante não-fotossintética de *Chlorella*. Enquanto *Chlorella* pode obter sua energia através da fotossíntese, as espécies do gênero *Prototheca* são heterotróficos obrigatórios. *Prototheca* são esféricos na forma, aproximadamente 2-15 micrômetros de diâmetro, e necessitam de flagelos. Em outras modalidades preferidas, as microalgas usadas nos métodos da invenção são selecionadas a partir da seguinte espécie de *Prototheca*: *Prototheca stagnora*, *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis*, *Prototheca wickerhamii* e *Prototheca zopfii*.

[00177] Em algumas modalidades, as microalgas preferidas para uso nos métodos da presente invenção. As regiões de DNA genômico conservado, tais como, entre outros, sequências genômicas conservadas entre três regiões principais de genes 18S de fungos e cinco regiões principais de genes 26S rRNA de fungos podem ser amplificadas a partir de espécies de levedura oleaginosa que pode ser, por exemplo, taxonomicamente relacionada às espécies de levedura oleaginosa usadas na presente invenção e comparadas com as regiões correspondentes das espécies preferidas. O exemplo 13 descreve o sequenciamento genômico das regiões 3' conservadas de 18S de fungos e regiões 5' de 26S rRNA 26S de fungos para 48 fitas de leveduras oleaginosas e as sequências genômicas são listadas como SEQ ID NOs: 37-76.

[00178] Em algumas modalidades, a levedura oleaginosa preferida para uso nos métodos da presente invenção têm sequências de DNA genômico de codificação 18S de fungos e sequência genômica 26S rRNA com pelo menos 75%, 85% ou 95% de identidade de nucleotídeos para um ou mais SEQ ID NOs: 37-76.

[00179] Em algumas modalidades, as microalgas preferidas para uso

nos métodos da presente invenção têm sequências de DNA genômico de codificação de rRNA 23S que são pelo menos 99%, ou, pelo menos, 95%, ou, pelo menos, 90%, ou pelo menos 85% idênticos a uma sequência de 23S rRNA de uma espécie *Chlorella*.

[00180] A *Prototheca* é um gênero de microalgas unicelulares que parece ser mutante não-fotossintética de *Chlorella*. Enquanto *Chlorella* pode obter sua energia através da fotossíntese, as espécies do gênero *Prototheca* são heterotróficos obrigatórios. *Prototheca* são esféricos na forma, aproximadamente 2-15 micrômetros de diâmetro, e necessitam de flagelos. Em outras modalidades preferidas, as microalgas usadas nos métodos da invenção são selecionadas a partir da seguinte espécie de *Prototheca*: *Prototheca stagnora*, *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis*, *Prototheca wickerhamii* e *Prototheca zopfii*.

[00181] Em algumas modalidades, as microalgas preferidas para uso nos métodos da presente invenção têm sequências de DNA genômico de codificação de 23S rRNA 23S que têm pelo menos 99%, ou, pelo menos, 95%, ou, pelo menos, 90%, ou pelo menos 85% idênticos a uma sequência 23S rRNA de uma espécie *Prototheca*.

[00182] Além da *Prototheca* e *Chlorella*, outras microalgas podem ser usadas de acordo com os métodos da presente invenção. Em outras modalidades preferidas, as microalgas são selecionadas a partir de um gênero ou espécie de qualquer um dos gêneros e espécies a seguir: *Parachlorella kessleri*, *Parachlorella beijerinckii*, *Neochloris oleabundans*, *Bracteococcus grandis*, *Bracteococcus cinnabarinus*, *Bracteococcus aerius*, *Bracteococcus sp.* or *Scenedesmus rebescens*. Outros exemplos não restritos de microalgas (incluindo *Chlorella*) estão listados na tabela 1, acima.

[00183] Além das microalgas, a levedura oleaginosa pode acumular mais de 20% do seu peso de célula seca como lipídios e serem úteis nos métodos da invenção. Em uma modalidade preferida da presente

invenção, um micro-organismo que produz um lipídio ou um micro-organismo a partir do qual o óleo pode ser extraído, recuperado, ou obtido, é uma levedura oleaginosa. Os exemplos de levedura oleaginosa que podem ser usados nos métodos da presente invenção incluem, entre outros, a levedura oleaginosa listada na tabela 2. Métodos ilustrativos para o cultivo de levedura oleaginosa (*Yarrowia lipolytica* e *Rhodotorula graminis*) para atingir alto teor de óleo são fornecidos nos exemplos a seguir.

Tabela 2. Leveduras Oleaginosas.

Candida apicola, *Candida* sp., *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus terricolus*, *Debaromyces hansenii*, *Endomycopsis vernalis*, *Geotrichum carabidarum*, *Geotrichum cucujoidarum*, *Geotrichum histeridarum*, *Geotrichum silvicola*, *Geotrichum vulgare*, *Hyphopichia burtonii*, *Lipomyces lipofer*, *Lypomyces orentalis*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces tetrasporous*, *Pichia mexicana*, *Rodosporidium sphaerocarpum*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula dairenensis*, *Rhodotorula diffluens*, *Rhodotorula glutinus*, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula mucilaginosa* var. *mucilaginosa*, *Rhodotorula terpenoidalis*, *Rhodotorula toruloides*, *Sporobolomyces alborubescens*, *Starmerella bombicola*, *Torulaspora delbruekii*, *Torulaspora pretoriensis*, *Trichosporon behrend*, *Trichosporon brassicae*, *Trichosporon domesticum*, *Trichosporon laibachii*, *Trichosporon loubieri*, *Trichosporon loubieri* var. *loubieri*, *Trichosporon montevidense*, *Trichosporon pullulans*, *Trichosporon* sp., *Wickerhamomyces Canadensis*, *Yarrowia lipolytica*, e *Zygoascus meyeriae*.

[00184] Em uma modalidade preferida da presente invenção, um micro-organismo que produz um lipídio ou um micro-organismo a partir do qual um lipídio pode ser extraído, recuperado ou obtido, é um fungo.

Exemplos de fungos que podem ser usados nos métodos da presente invenção incluem, entre outros, os fungos listados na tabela 3.

Tabela 3. Fungos Oleaginosos.

<i>Mortierella</i> , <i>Mortierella vinacea</i> , <i>Mortierella alpine</i> , <i>Pythium debaryanum</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Pennicillium lilacinum</i> , <i>Hansenula</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Malbranchea</i> , <i>Rhizopus</i> , e <i>Pythium</i>
--

[00185] Assim, em uma modalidade da presente invenção, o micro-organismo usado para a produção de biomassa microbiana para uso nos métodos da invenção é um fungo. Exemplos de fungos adequados (por exemplo, *Mortierella alpine*, *Mucor circinelloides* e *Aspergillus ochraceus*) incluem aqueles que demonstraram ser receptivos à manipulação genética, como descrito na literatura (vide, por exemplo, *Microbiology*, Jul; 153(Pt.7): 2013-25 (2007); *Mol Genet Genomics*, Jun; 271(5): 595-602 (2004); *Curr Genet*, Mar;21(3):215-23 (1992); *Current Microbiology*, 30(2):83-86 (1995); Sakuradani, NISR Research Grant, "Studies of Metabolic Engineering of Useful Lipid-producing Microorganisms" (2004); e PCT/JP2004/012021).

[00186] Em outras modalidades da presente invenção, um micro-organismo que produz um lipídio ou um micro-organismo a partir do qual o óleo pode ser extraído, recuperado, ou obtido é uma bactéria oleaginosa. Bactérias oleaginosas são bactérias que podem acumular mais de 20% do seu peso de célula seca como lipídios. Espécies de bactérias oleaginosas para uso nos métodos da presente invenção, incluem espécies do gênero *Rhodococcus*, como *Rhodococcus opacus* e *Rhodococcus sp.* Métodos de cultivo de bactérias oleaginosas, como *Rhodococcus opacus*, são conhecidos no estado da técnica (vide Waltermann, et al, (2000) *Microbiology*, 146:1143-1149). São fornecidos métodos ilustrativos para o cultivo de *Rhodococcus opacus* para atingir alto teor de óleo nos exemplos abaixo.

[00187] Para produzir biomassa microbiana contendo óleo adequado para uso nos métodos da invenção, os micro-organismos são cultivados para a produção de óleo (por exemplo, hidrocarbonetos, lipídios, ácidos graxos, aldeídos, álcoois e alcanos). Este tipo de cultura é normalmente primeiro realizada em pequena escala e, inicialmente, pelo menos, em condições em que o micro-organismo de partida possa crescer. Por exemplo, se o micro-organismo de partida é um fotoautótrofo, a cultura inicial é feita na presença de luz. As condições de cultura podem ser alteradas se o micro-organismo é evoluído ou modificado para crescer de forma independente da luz. A cultura para fins de produção de hidrocarbonetos é preferencialmente realizada em grande escala. Preferencialmente, uma fonte de carbono fixo está presente em excesso. A cultura também pode estar exposta à luz por um período ou todo período, se desejado ou benéfico.

[00188] As microalgas podem ser cultivadas em meios líquidos. A cultura pode ser contida em um biorreator. Opcionalmente, o biorreator não permite a entrada de luz. Alternativamente, as microalgas podem ser cultivadas em fotobioreatores que contêm uma fonte de carbono fixo e permitem que a luz atinja as células. Para as células de microalgas que podem utilizar a luz como fonte de energia, a exposição dessas células à luz, mesmo na presença de uma fonte de carbono fixo que as células transportam e utilizam (ou seja, o crescimento mixotrófico), no entanto, acelera o crescimento em relação ao cultivo dessas células no escuro. Os parâmetros de condição de cultura podem ser manipulados para otimizar a produção total de óleo, a combinação de espécies de hidrocarbonetos produzidos e/ou produção de uma dada espécie de hidrocarboneto. Em alguns casos, é preferível células de cultura no escuro, como, por exemplo, ao utilizar fermentadores extremamente grandes (40 mil litros ou mais) que não permitem que a luz atinja uma proporção significativa (ou qualquer) da cultura.

[00189] O meio de cultura de microalgas normalmente contém componentes como uma fonte de nitrogênio fixa, oligoelementos, opcionalmente, um tampão para a manutenção do pH e fosfato. Os componentes, além de uma fonte de carbono fixo, tais como acetato ou glicose, podem incluir sais como o cloreto de sódio, principalmente para microalgas marinhas. Exemplos de oligoelementos incluem boro, zinco, cobalto, cobre, manganês, molibdênio e, em, por exemplo, as respectivas formas de ZnCl_2 , H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Outros parâmetros de culturas também podem ser manipulados, como o pH do meio de cultura, a identidade e a concentração de oligoelementos e outros constituintes do meio.

[00190] Para os organismos capazes de crescer em uma fonte de carbono fixo, a fonte de carbono fixo pode ser, por exemplo, glicose, frutose, sacarose, galactose, xilose, manose, ramnose, glicerol, N-acetilglicosamina, floridosídeo, ácido glicurônico e/ou acetato. Uma ou mais fonte(s) de carbono fixa(s) fornecida(s) exogenamente podem ser fornecidas ao meio de cultura a uma concentração de, pelo menos, cerca de $50 \mu\text{M}$ de pelo menos 500mM , e em várias quantias nesta faixa (ou seja, $100 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$, 5mM , 50mM).

[00191] Certas microalgas podem ser cultivadas na presença de luz. O número de fótons que atinge uma cultura de células de microalgas pode ser manipulado, bem como outros parâmetros, tais como o espectro de comprimento de onda e relação de escuro: horas de luz por dia. Microalgas podem ser cultivadas em luz natural, bem como combinações simultâneas e/ou alternativas de luz natural e luz artificial. Por exemplo, as microalgas do gênero *Chlorella* podem ser cultivadas sob luz natural durante o dia e sob luz artificial durante a noite.

[00192] O teor de gás de um fotobioreator para crescer micro-organismos, tal como microalgas, pode ser manipulado. Parte do volume de um fotobioreator pode conter gás ao invés de líquidos. As

entradas de gás podem ser usadas para bombear gases no fotobioreator. Qualquer gás pode ser bombeado para um fotobioreator, incluindo ar, misturas de ar/CO₂, gases nobres como argônio e outros. A taxa de entrada de gás em um fotobioreator também pode ser manipulada. Ao aumentar o fluxo de gás em um fotobioreator, aumenta a turbidez de uma cultura de microalgas. A colocação de gases d transporte também pode afetar a turbidez de uma cultura a uma determinada taxa de fluxo de gás. As misturas Ar/CO₂ podem ser moduladas para gerar quantidades ideais de CO₂ para o crescimento máximo por um organismo particular. As microalgas crescem significativamente mais rápido na luz, por exemplo, 3% de CO₂/97% no ar do que 100% no ar. 3% de CO₂/97% de ar tem aproximadamente 100 vezes mais CO₂ do que o encontrado no ar. Por exemplo, as misturas de CO₂ e ar em uma faixa de cerca de 99,75% de ar: 0,25% de CO₂ para 95,00% de ar: 5,0% de CO₂ pode ser infundido em um biorreator ou fotobioreator.

[00193] As culturas de microalgas também podem ser submetidas à mistura usando dispositivos como lâminas giratórias e impulsores, agitação de cultura, barras de agitação, infusão de gás pressurizado, e outros instrumentos; tais métodos podem ser usados para assegurar que todas as células em um fotobioreator estão expostas à luz, mas certamente encontram aplicação em culturas de células que não estão usando a luz como fonte de energia.

[00194] Algumas espécies de microalgas podem crescer utilizando uma fonte de carbono fixo, como a glicose ou acetato, na ausência de luz. Esse crescimento é conhecido como crescimento heterotrófico. Para *Chlorella* protothecoides, por exemplo, os resultados de crescimento heterotrófico em alta produção de biomassa e acúmulo de alto teor lipídico. Assim, uma alternativa para o crescimento fotossintético e propagação de micro-organismos, como descrito acima,

é o uso de crescimento heterotrófico e propagação de micro-organismos, em condições em que uma fonte de carbono fixo fornece energia para o crescimento e acúmulo de lipídios. Em algumas modalidades, a fonte de energia fixa de carbono compreende material celulósico, incluindo material celulósico despolimerizado, um açúcar de 5 carbonos ou um açúcar de 6 carbonos.

[00195] Métodos para o crescimento e propagação de *Chlorella protothecoides* a níveis elevados do óleo como uma porcentagem do peso seco foram relatados (vide, por exemplo, Miao e Wu, J. Biotechnology, 2004, 11:85-93 e Miao e Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846, relatando os métodos para a obtenção de 55% de óleo de peso celular seco).

[00196] A publicação PCT WO2008/151149, incorporada neste documento para referência, descreve as condições de crescimento preferidas para a *Chlorella*. Múltiplas espécies de *Chlorella* e múltiplas cepas dentro de uma espécie podem ser cultivadas na presença de glicerol. O pedido de patente acima descreve os parâmetros de cultura que incorporam o uso de glicerol para a fermentação de vários gêneros de microalgas. Múltiplas espécies de *Chlorella* e cepas não só se proliferam muito bem em glicerol grau reagente purificado, mas também no subproduto do glicerol acidulado e não-acidulado de transesterificação de biodiesel. Em alguns casos, as microalgas, como cepas *Chlorella*, sofrem divisão celular mais rápido na presença de glicerol do que na presença de glicose. Nestes casos, os processos de crescimento em dois estágios nos quais as células são primeiro alimentadas glicerol para aumentar a densidade de células, e depois são alimentadas de glicose para acumular lipídios, pode aperfeiçoar a eficiência com que os lipídios são produzidos.

[00197] Outras matérias-primas para o cultivo de microalgas sob condições de crescimento heterotrófico para fins da presente invenção

incluem misturas de glicerol e glicose, as misturas de glicose e xilose, misturas de frutose e glicose, sacarose, glicose, frutose, xilose, arabinose, manose, galactose, acetato, e melaço. Outras matérias-primas apropriadas incluem amido de milho, polpa de sacarina, e painço amarelo em combinação com as enzimas de despolimerização.

[00198] Para a produção de lipídios e óleo, as células, incluindo células recombinantes, normalmente são fermentadas em grandes quantidades. O cultivo pode ser em grandes volumes líquidos, tais como em culturas em suspensão como um exemplo. Outros exemplos incluem começar com uma pequena cultura de células que se expande em uma grande biomassa em combinação com o crescimento e propagação celular bem como a produção de lipídios (óleo). O biorreatores ou fermentadores de aço podem ser usados para acomodar grandes volumes de cultura. Por essas fermentações, o uso de condições de crescimento fotossintético pode ser impossível ou pelo menos pouco viável e eficiente, por isso preferem-se condições de crescimento de heterotróficos.

[00199] As fontes de nutrientes apropriadas para a cultura num fermentador para as condições de crescimento heterotrófico incluem matérias-primas como um ou mais dos seguintes: fonte de carbono fixo, como a glicose, amido de milho, material celulósico despolimerizado, sacarose, cana de açúcar, sacarina, lactose, soro de leite, melaço, ou semelhantes; uma fonte de nitrogênio, como a proteína, farelo de soja, bebidas alcoólicas, milhocina, amônia (pura ou em forma de sal), nitrato ou sal de nitrato; e uma fonte de fósforo, tais como sais de fosfato. Além disso, um fermentador para as condições de crescimento de heterotrófico permite o controle das condições de cultivo, como temperatura, pH, tensão de oxigênio e níveis de dióxido de carbono. Opcionalmente, componentes gasosos, como oxigênio ou nitrogênio, podem formar bolhas através de uma cultura líquida. Outras fontes de

amido (glicose) incluem batatas, trigo, arroz e sorgo. Outras fontes de carbono incluem correntes de processo, como glicerina de grau técnico, licor negro, e ácidos orgânicos, tais como acetato e melaço. As fontes de carbono também podem ser fornecidas como uma mistura, tal como uma mistura de sacarose e polpa de sacarina despolimerizada.

[00200] Um fermentador para as condições de crescimento heterotrófico pode ser usado para permitir que as células sejam submetidas às várias fases do seu ciclo fisiológico. Como exemplo, um inóculo de células produtoras de lipídios pode ser introduzido em um meio seguido por um período de defasagem (fase de retardo) antes de as células começam a se propagar. Após o período de atraso, a taxa de propagação aumenta de forma constante e entra na fase log ou fase exponencial. A fase exponencial por sua vez é seguida por uma desaceleração da propagação devido à diminuição em nutrientes como o nitrogênio, aumento de substâncias tóxicas, e mecanismos "quorum sensing". Após esta desaceleração, a propagação é interrompida, e as células entram em uma fase estacionária ou estado de crescimento constante, dependendo do ambiente específico fornecido às células.

[00201] Em um método de cultura de heterotróficos útil para fins da presente invenção, os micro-organismos são cultivados usando biomassa celulósica despolimerizada como matéria-prima. Ao contrário de outras matérias-primas que podem ser usadas para os micro-organismos da cultura, como o amido de milho ou sacarose da cana de açúcar ou sacarina, a biomassa celulósica (despolimerizada ou não) não é adequada para o consumo humano. A biomassa celulósica (por exemplo, espiga, como espiga de milho) é barata e de fácil acesso, no entanto, as tentativas de usar esse material como matéria-prima para o fermento falharam. Em particular, tais matérias-primas são inibitórias para o crescimento do fermento e o fermento não pode usar os açúcares de carbono 5 produzido a partir de materiais celulósicos (por exemplo,

xilose de hemi-celulose). Por outro lado, as microalgas podem proliferar em material celulósico despolimerizado. Assim, a invenção contempla métodos de cultivo de microalgas em condições de crescimento heterotrófico na presença de um material celulósico e/ou um açúcar de 5 carbonos. Os materiais celulósicos geralmente incluem: 40 a 60% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 10 a 30% de lignina.

[00202] Os materiais celulósicos adequados incluem os resíduos das culturas energéticas herbáceas e lenhosas, bem como culturas agrícolas, ou seja, as partes da planta, principalmente caules e folhas normalmente não retirados dos campos com o principal alimento ou produto de fibra. Exemplos incluem resíduos agrícolas, como bagaço de cana, casca de arroz, fibra de milho (incluindo talos, folhas, cascas, e espigas), palha de trigo, palha de arroz, polpa de sacarina, polpa cítrica, cascas de frutas cítricas; resíduos florestais, como timberadeira e desbastes e resíduos de madeira e madeiras resinosas de operações timber; resíduos de madeira, como resíduos de serraria (lascas de madeira, serragem) e resíduos de celulose, resíduos urbanos, tais como pedaços de papel de resíduos sólidos urbanos, resíduos de madeira urbanos e resíduos verdes urbanos, tais como o painço amarelo e resíduo de construção em madeira. Outros celulósicos incluem culturas de celulose, tais como painço amarelo, madeira híbrida, miscanto, cana-de-fibra e sorgo. Os açúcares de 5 carbonos que são produzidos a partir de tais materiais incluem xilose.

[00203] Alguns micróbios são capazes de processar material celulósico e usam diretamente materiais celulósicos como fonte de carbono. No entanto, o material celulósico pode precisar ser tratado para aumentar a área de superfície acessível ou para a celulose ser a primeira dividida como uma preparação para a utilização microbiana como fonte de carbono. Formas de preparação ou pré-tratamento de material celulósico para digestão enzimática são bem conhecidos no

estado da técnica. Os métodos são divididos em duas categorias principais: (1) quebra de material celulósico em partículas menores para aumentar a área de superfície acessível, e (2) tratamento químico do material celulósico para criar um substrato útil para a digestão enzimática.

[00204] Os métodos para aumentar a área de superfície acessível incluem explosão de vapor, que envolve o uso de vapor em altas temperaturas para dividir materiais celulósicos. Devido à exigência de alta temperatura do processo, alguns açúcares no material celulósico podem ser perdidos, reduzindo assim a fonte de carbono disponível para digestão enzimática (vide , por exemplo, Chahal, D.S. *et al.*, *Proceedings of the 2nd World Congress of Chemical Engineering*; (1981) and Kaar *et al.*, *Biomass and Bioenergy* (1998) 14(3): 277-87). A explosão de amônia permite uma explosão de material celulósico em uma temperatura mais baixa, mas é mais caro para execução e a amônia pode interferir nos processos de digestão enzimática subsequente (vide , por exemplo, Dale, B.E. *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* (1982); 12: 31-43). Outra técnica de explosão envolve o uso de explosão de dióxido de carbono supercrítico para quebrar o material celulósico em fragmentos menores (vide , por exemplo, Zheng *et al.*, *Biotechnology Letters* (1995); 17(8): 845-850).

[00205] Métodos para tratar quimicamente o material celulósico para criar substratos úteis para a digestão de enzimas também são conhecidos no estado da técnica. A Patente US 7.413.882, incorporada neste documento para referência, descreve o uso de micróbios geneticamente modificados que secretam beta-glicosidase no caldo de fermentação e tratamento de material celulósico com o caldo de fermentação para melhorar a hidrólise de material celulósico em glicose. O material celulósico também pode ser tratado com ácidos fortes e bases para ajudar à digestão enzimática subsequente. A Patente US

3.617.431, incorporada neste documento para referência, descreve o uso de digestão alcalina para quebrar materiais celulósicos.

[00206] Os micro-organismos podem ter a capacidade de usar uma matéria-prima não comestível, tais como material celulósico ou glicerol, como fonte de carbono (ou um material celulósico pré-tratado como fonte de carbono) e a capacidade natural para produzir óleos comestíveis. Ao utilizar essas duas propriedades, material celulósico ou glicerol, que normalmente não é parte da cadeia alimentar humana (em oposição a glucose de milho e sacarose da cana de açúcar e da sacarina, que são composições de alimentos adequados para consumo humano) podem ser convertidos em óleos comestíveis altamente nutritivos, que podem fornecer nutrientes e calorias, como parte da dieta diária humana (ou animal). Desta forma, matérias-primas não comestíveis podem ser transformadas em óleos comestíveis altamente nutritivos e outros produtos alimentícios e composições de alimentos que contêm estes óleos comestíveis altamente nutritivos, bem como óleos úteis para outros fins.

[00207] Os biorreatores podem ser empregados para os métodos de crescimento e propagação heterotróficos. Como será considerado, providências feitas para tornar a luz disponível para as células em métodos de crescimento de fotossíntese são desnecessárias quando se utiliza uma fonte de carbono fixo nos métodos de crescimento e propagação heterotróficos descritos neste documento.

[00208] Os exemplos específicos de condições de processo e métodos de crescimento e propagação heterotrófica descritos neste documento podem ser combinados de todas as formas para aumentar a eficiência de crescimento microbiano e produção de lipídios. Por exemplo, os micróbios com maior capacidade de utilizar qualquer uma das matérias-primas acima descritas para o aumento da proliferação e/ou produção de lipídios podem ser usados nos métodos da invenção.

[00209] O crescimento mixotrófico envolve o uso de luz e fonte de carbono fixo como fontes de energia para cultivar células cultivar. O crescimento mixotrófico pode ser realizado em um fotobiorreator. As microalgas podem ser cultivadas e mantidas em fotobiorreatores fechados, feito de diferentes tipos de material transparente ou semitransparente. Esse material pode incluir caixas de Plexiglass®, caixas de vidro, sacolas feitas a partir de substâncias como o polietileno, tubos transparentes ou semitransparentes e outros materiais. As microalgas podem ser cultivadas e mantidas em fotobiorreatores abertos, tais como lagoas, tanques de decantação e outros recipientes não fechados. A discussão a seguir de fotobiorreatores úteis para as condições de crescimento mixotrófico é aplicável a condições de crescimento fotossintético.

[00210] Os fotobiorreatores podem ter portas que permitem entrada de gases, sólidos, semissólidos e líquidos dentro da câmara contendo microalgas. As portas estão geralmente ligadas a tubos ou outros meios de substâncias de transporte. As portas de gás, por exemplo, transmitem gases para a cultura. O bombeamento de gases em um fotobiorreator pode servir tanto para alimentar as células de CO₂ e outros gases e para arejar a cultura e, portanto, gerar turbidez. A quantidade de turbidez de uma cultura varia conforme o número e a posição das portas de gás são alterados. Por exemplo, as portas de gás podem ser colocadas ao longo do fundo de um saco de polietileno cilíndrico. As microalgas crescem mais rápido quando o CO₂ é adicionado ao ar e formam bolhas em um fotobiorreator. Por exemplo, uma mistura de 5% de CO₂ e 95% de ar pode ser infundida em um fotobiorreator contendo células *Botryococcus* para tais fins (vide , por exemplo, *J Agric Food Chem.* 54(13):4593-9 (2006); *J Biosci Bioeng.* 87(6):811-5 (1999); and *J Nat Prod.* 66(6):772-8 (2003)).

[00211] Os fotobiorreatores podem ser expostos a uma ou mais

fontes de luz para fornecer microalgas com luz como fonte de energia através de luz direcionada a uma superfície do fotobioreator. Preferencialmente a fonte de luz fornece uma intensidade que é suficiente para as células crescerem, mas não tão intensa a ponto de causar dano oxidativo ou causar uma resposta fotoinibidora. Em alguns casos, uma fonte de luz tem um comprimento de onda que imita ou aproximadamente imita a faixa do sol. Em outros casos, uma gama de comprimento de onda diferente é usada. Os fotobiorreatores podem ser colocados ao ar livre ou em uma instalação de estufas ou outros que permitam que a luz solar atinja uma superfície. As intensidades de fóton preferidas para espécies do gênero *Botryococcus* são entre 25 e 500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (vide , por exemplo *Photosynth Res.* 84(1-3):21-7 (2005)).

[00212] Como mencionado acima, os fotobiorreatores preferencialmente tem uma ou mais portas que permitam a entrada de meio. Não é necessário que apenas uma substância entre ou deixem de um porto. Por exemplo, uma abertura pode ser usada para fluxo de meios de cultura para o fotobioreator e depois podem ser usados para a amostragem, entrada de gás, saída de gás, ou outros fins. Em alguns casos, um fotobioreator é preenchido com meios de cultura no início de uma cultura e nenhum meio de crescimento é infundido após a cultura ser inoculada. Em outras palavras, a biomassa de microalgas é cultivada em um meio aquoso para um período de tempo durante o qual as microalgas reproduzem e aumentam em número, no entanto, as quantidades de meio de cultura aquoso não fluem através do fotobioreator durante todo o período de tempo. Assim, em algumas modalidades, meio de cultura aquoso não fluiu através do fotobioreator após a inoculação.

[00213] Em outros casos, os meios de cultura podem ser fluidos através do fotobioreator em todo o período de tempo durante o qual as microalgas se reproduzem e aumentam em número. Em algumas

modalidades o meio é infundido na fotobioreator após a inoculação, mas antes que as células atinjam uma densidade desejada. Em outras palavras, um regime de fluxo turbulento de entrada de gás e entrada de meio não é mantido para a reprodução de microalgas até um aumento desejado no número de microalgas que foram alcançadas.

[00214] Os fotobiorreatores normalmente têm uma ou mais portas que permitem a entrada de gás. O gás pode servir tanto para fornecer nutrientes, tais como CO₂, bem como para fornecer a turbulência nos meios de cultura. A turbulência pode ser alcançada pela colocação de uma abertura de entrada de gás abaixo do nível dos meios de cultura aquosa de modo que o gás que entra no fotobioreator forme bolhas na superfície da cultura. Uma ou mais aberturas de saída de gás permitem que o gás escape, evitando assim o acúmulo de pressão na fotobioreator. Preferencialmente uma abertura de saída de gás leva a uma válvula única que impede que os micro-organismos contaminantes entrem no fotobioreator. Em alguns casos, as células são cultivadas em um fotobioreator por um período de tempo durante o qual as microalgas reproduzem e aumentam em número, no entanto, um regime de fluxo turbulento com vórtices turbulentos, predominantemente ao longo do meio de cultura causada pela entrada de gás não é mantido por todo período de tempo. Em outros casos, um regime de fluxo turbulento com vórtices turbulentos, predominantemente ao longo do meio de cultura causada pela entrada de gás pode ser mantido por todo o período de tempo durante o qual as microalgas reproduzem e aumentam em número. Em alguns casos, uma faixa predeterminada de razões entre a escala do fotobioreator e a escala de vórtices não é mantida para o período de tempo durante o qual as microalgas reproduzem e aumentam em número. Em outros casos, uma variação pode ser mantida.

[00215] Os fotobiorreatores normalmente têm pelo menos uma

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

[00216] Os micro-organismos úteis, de acordo com os métodos da presente invenção, são encontrados em vários locais e ambientes em todo o mundo. Como consequência de seu isolamento de outras espécies e suas divergências resultantes da evolução, o meio de crescimento particular para o crescimento ideal e geração de óleo e/ou lipídios a partir de uma espécie particular de micróbio pode ser determinada experimentalmente. Em alguns casos, certas cepas de micro-organismos podem ser incapazes de crescer em um meio de crescimento particular devido à presença de algum componente inibitório ou a ausência de alguns requisitos nutricionais essenciais exigidos pela cepa particular de micro-organismo. Há uma variedade de métodos conhecidos no estado da técnica para cultivar uma grande variedade de espécies de microalgas para acumular altos níveis de lipídios como percentagem do peso seco das células, e métodos para determinar as condições de crescimento ideal para qualquer espécie de interesse também são conhecidos no estado da técnica.

[00217] Os meios de crescimento sólidos e líquidos estão geralmente disponíveis a partir de uma ampla variedade de fontes e as instruções para a preparação dos meios de comunicação particular que é adequado para uma grande variedade de cepas de micro-organismos

pode ser encontrada, por exemplo, [http:// www.utex.org/](http://www.utex.org/), um site mantido pela Universidade do Texas em Austin para a sua colecção de culturas de algas (UTEX). Por exemplo, água fresca e vários meios de água salgada incluem aqueles apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Meio de Alga.

Meio com água fresca	Meio com água salgada
1/2 Meio CHEV Diatom	1% F/2
1/3 Meio CHEV Diatom	1/2 Meio de Água Salgada Enriquecido Água Salgada
1/5 Meio CHEV Diatom	1/2 Meio Erdschreiber
1:1 DYIII/PEA + Gr+	1/2 Meio Solo+Água Salgada
2/3 Meio CHEV Diatom	1/3 Meio Solo+Água Salgadao
Meio 2X CHEV Diatom	1/4 ERD
Meio Ag Diatom	1/4 Meio Solo+Água Salgada
Meio Allen	1/5 Meio Solo+Água Salgada
Meio BG11-1	2/3 Meio de Água Salgada Enriquecido
Meio Bold 1NV	20% Allen + 80 % ERD
Meio Bold 3N	2X Meio de Erdschreiber
Meio Botryococcus	2X Meio de Solo+Água Salgada
Meio Bristol	5% de Meio F/2
Meio CHEV Diatom	5/3 Meio Solo+ Agar marinho
Meio de Chu	Meio marinho Artificial
Meio CR1 Diatom	Meio BG11-1 + .36% NaCl
Meio CR1+ Diatom	Meio BG11-1 + 1% NaCl
Meio CR1-S Diatom	Bold 1NV:Erdschreiber (1:1)
Meio Cyanidium	Bold 1NV:Erdschreiber (4:1)
Meio Cianofíceas	Meio Bristol-NaCl
Meio Desmid	Meio marinho Dasycladales
Meio DYIII	Meio de Água Salgada Enriquecido
Meio Euglena	Meio de Erdschreiber's
Meio HEPES	ES/10 Meio de Água Salgada Enriquecido
Meio J	ES/2 Meio de Água Salgada Enriquecido
Meio Malte	ES/4 Meio de Água Salgada Enriquecido

Meio com água fresca	Meio com água salgada
Meio MES	F/2 Meio
Meio Modificado Bold 3N	F/2+NH ₄
Meio Modificado COMBO	LDM Meio
Meio N/20	2 X CHEV Modificado
Meio Ochromonas	2 X CHEV + Solo Modificado
Meio P49	Meio de Água Salgada Artificial Modificado
Meio Polytomella	Modificado CHEV
Meio Proteose	Meio Porfridio
Media Snow Algae	Solo+Meio marinho
Meio de extrato do Solo t	Meio SS Diatom
Água do Solo: Meio BAR	
Água do Solo: Meio GR-	
Água do Solo: Meio GR-/NH ₄	
Água do Solo: GR+ Meio	
Água do Solo: Meio GR+/NH ₄	
Água do Solo: Meio PEA	
Água do Solo: Meio Peat	
Água do Solo: Meio VT	
Meio de espirulina	
Meio Tap	
Meio Trebouxia	
Meio Volvocacean	
Meio Volvocacean-3N	
Meio Volvox	
Meio Volvox-Dextrose	
Meio Waris	
Waris+ Meio de extrato do Solo	

[00218] Um meio adequado para cultivo de *Chlorella protothecoides* compreende Meio de Proteose. Este meio é adequado para culturas axênicas, e um volume de 1L do meio (pH ~ 6,8) pode ser preparado por adição de 1g de proteose peptona a 1 litro de Bristol Meio. Bristol

meio é composto por NaNO_3 2,94 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,17 mM, MgSO_4 0,3 mM de $7\text{H}_2\text{O}$ •, 0,43 mM, KH_2PO_4 1,29 mM, e NaCl 1,43 mM em solução aquosa. Para 1,5% de ágar, 15 g de ágar podem ser adicionados a 1 L da solução. A solução é coberta e autoclavada, e em seguida armazenada a uma temperatura refrigerada antes de usar.

[00219] Outros meios adequados para uso com os métodos da invenção podem ser facilmente identificados através da consulta do URL acima identificado, ou consultando outras organizações que mantêm culturas de micro-organismos, SAG da Coleta de Cultura de Algas na Universidade de Göttingen (Göttingen, Alemanha), CCAP, coleta de cultura de algas e protozoários administrados pela Associação Escocesa de Ciência Marinha (Escócia, Reino Unido), e CCALA coleta de cultura do laboratório de algas no Instituto de Botânica (Třeboň, República Checa).

[00220] Os presentes métodos são particularmente adequados para microalgas com um alto teor lipídico (por exemplo, pelo menos 20% de lipídios em peso seco). As condições de processo podem ser ajustadas para aumentar o peso percentual de células que é de lipídios. Por exemplo, em certas modalidades, um micróbio (por exemplo, uma microalga) é cultivado na presença de uma concentração limite de um ou mais nutrientes, como, por exemplo, nitrogênio e/ou fósforo e/ou enxofre, enquanto fornece um excesso de energia de carbono fixo, como a glicose. A limitação de nitrogênio tende a aumentar a produção de lipídios microbianos em relação ao rendimento de lipídios microbianos em uma cultura na qual o nitrogênio é fornecido em excesso. Em modalidades particulares, o aumento na produção de lipídios é de pelo menos cerca de 10% a 100% para 500% ou mais. O micróbio pode ser cultivado na presença de uma quantidade de um nutriente limitante para uma parte do período de cultura total ou durante todo o período. Em modalidades particulares, a concentração de

nutrientes é ciclada entre uma concentração limitante e uma concentração não limitante, pelo menos, duas vezes durante o período de cultivo total.

[00221] Para aumentar lipídios como a percentagem do peso seco das células, o acetato pode ser empregado na matéria-prima para um micróbio que produz lipídio (por exemplo, microalgas). O acetato alimenta diretamente o ponto de metabolismo que se inicia a síntese de ácidos graxos (ou seja, acetil-CoA), fornecendo assim acetato na cultura pode aumentar a produção de ácidos graxos. Geralmente, o micróbio é cultivado na presença de uma quantidade suficiente de acetato para aumentar a produção de lipídios microbianos, e/ou rendimento de ácido graxo microbiano, especificamente, em relação ao rendimento de lipídios microbianos (por exemplo, ácidos graxos) na ausência de acetato. A alimentação de acetato é um componente útil das formas previstas neste documento para a geração de biomassa de microalgas que tem uma elevada percentagem de peso seco de células como lipídios.

[00222] Em um estado de crescimento constante, as células acumulam óleos (lipídios), mas não sofrem divisão celular. Em uma modalidade da invenção, o estado de crescimento é mantido, pelo fornecimento de todos os componentes do meio de crescimento original para as células com exceção de uma fonte de nitrogênio fixo. Ao cultivar células de microalgas pela alimentação de todos os nutrientes inicialmente previstos para as células, exceto uma fonte de nitrogênio fixo, como através da alimentação das células por um período prolongado de tempo, pode resultar em uma alta porcentagem de peso seco de células sendo lipídio. Em algumas modalidades, os nutrientes, tais como oligometais, fosfatos e outros componentes, que não seja uma fonte de carbono fixo, podem ser fornecidos em uma concentração muito inferior ao inicialmente previsto na fermentação de partida para

evitar "superalimentação" as células com os nutrientes que não serão usados pelas células, reduzindo assim os custos.

[00223] Em outras modalidades, a biomassa lipídica alta (óleo) pode ser gerada por uma fonte de alimentação de carbono fixo para as células após o nitrogênio fixo ser consumida por longos períodos de tempo, de pelo menos 8 a 16 ou mais dias. Em algumas modalidades, as células podem acumular óleo na presença de uma fonte de carbono fixo e na ausência de uma fonte de nitrogênio fixo por mais de 30 dias. Preferencialmente, os micro-organismos cultivados com as condições aqui descritas e conhecidas na técnica compreendem lipídios em uma faixa de, pelo menos, cerca de 20% de lipídio em peso seco de células a cerca de 75% de lipídios em peso de célula seco.

[00224] Outra ferramenta para permitir que as células acumulem uma alta percentagem de peso seco de célula como lipídio envolve a seleção de matérias-primas. Múltiplas espécies de *Chlorella* e múltiplas cepas dentro de uma espécie de *Chlorella* acumulam um maior percentual de peso seco de células como lipídios quando cultivadas na presença de subproduto de biodiesel de glicerol do que quando cultivadas na presença de concentrações equivalentes de glicerol de grau de reagente puro. Da mesma forma, *Chlorella* pode acumular uma maior percentagem de peso seco de células lipídicas como quando cultivadas na presença de uma mistura de concentração igual (por cento em peso) de glicerol e glicose do que quando cultivadas na presença de glicose apenas.

[00225] Outra ferramenta para permitir que as células acumulem uma alta percentagem de peso seco como célula lipídica envolve a seleção de matérias-primas, bem como o momento da adição de matérias-primas. Por exemplo, *Chlorella* pode acumular um maior percentual de peso seco de células lipídicas quando glicerol é adicionado a uma cultura para um primeiro período de tempo, seguido

pela adição de glicose e cultivo por um segundo período de tempo, quando a mesma quantidade de glicerol e glicose é somada no início da fermentação. Vide Publicação PCT 2008/151149, incorporada neste documento para referência.

[00226] A porcentagem de lipídios (óleo) de peso seco de células na produção de lipídios microbianos pode, portanto, aumentar pelo menos com relação a certas células, através da utilização de matérias-primas e separação temporal de fontes de carbono, bem como pela manutenção de células em um estado de crescimento heterotrófico em que se acumulam óleo, mas não sofrem divisão celular. Os exemplos abaixo mostram crescimento de diversos micróbios, incluindo várias cepas de microalgas, para acumular altos níveis de lipídios como DCW.

[00227] Em outra modalidade, a produção de lipídios aumenta através da cultura de um micróbio que produz lipídio (por exemplo, microalgas), na presença de um ou mais co-fator (es) para uma enzima via lipídio (por exemplo, uma enzima sintética de ácido graxo). Geralmente, a concentração de cofator(es) é suficiente para aumentar o rendimento de lipídios microbianos (ex., ácido graxo) em relação ao rendimento de lipídios microbianos na ausência do(s) cofator (es). Em uma modalidade particular, o(s) cofator(es) são fornecidos para a cultura através da inclusão na cultura de um micróbio (por exemplo, microalgas), contendo um gene exógeno que codifica o(s) co-fator(es). Alternativamente, o(s) cofator(es) pode(m) ser fornecido(s) a uma cultura através da inclusão de um micróbio (por exemplo, microalgas), contendo um gene exógeno que codifica uma proteína que participa na síntese do cofator. Em certas modalidades, os cofatores adequados incluem qualquer vitamina exigida por via de uma enzima lipídica, como, por exemplo: biotina ou pantotenato. Os genes que codificam cofatores adequados para uso na invenção ou que participam da síntese de tais cofatores são bem conhecidos e podem ser introduzidos nos micróbios

(por exemplo, microalgas), usando construtos e técnicas, tais como descritos neste documento.

[00228] As condições de processo podem ser ajustadas para aumentar o rendimento de lipídios adequados para usos múltiplos, incluindo, entre outros, biodiesel. As condições de processo também podem ser ajustadas para reduzir o custo de produção. Por exemplo, em certas modalidades, um micróbio (por exemplo, uma microalga) é cultivado na presença de uma concentração limite de um ou mais nutrientes, como, por exemplo, nitrogênio, fósforo e/ou enxofre. Essa condição tende a aumentar o rendimento de lipídios microbianos em relação ao rendimento de lipídios microbianos em uma cultura em que o nutriente é fornecido em excesso. Em modalidades particulares, o aumento na produção de lipídios é pelo menos cerca de: 10% 20 a 500%.

[00229] Ao limitar um nutriente pode-se também reduzir a quantidade de biomassa produzida. Portanto, a concentração limite é normalmente a que aumenta o rendimento em porcentagem de lipídios de uma biomassa dada, mas não reduz a biomassa total. Em modalidades exemplares, a biomassa é reduzida em não mais que cerca de 5% a 25%. O micróbio pode ser cultivado na presença de uma quantidade limitante de nutrientes para uma parte do período de cultura total ou durante todo o período. Em modalidades particulares, a concentração de nutrientes é ciclada entre uma concentração limitante e uma concentração não limitante, pelo menos, duas vezes durante o período de cultivo total.

[00230] A biomassa de microalgas gerada pelos métodos de cultura descritos neste documento compreende óleo de microalgas (lipídios), bem como outros elementos gerados por micro-organismos ou incorporados por micro-organismos do meio de cultura durante a fermentação.

[00231] A biomassa de microalgas com elevada percentagem de acúmulo de óleo/lipídio por peso seco foi gerado utilizando diferentes métodos de cultura conhecidos no estado da técnica. A biomassa de microalgas com um maior percentual de acúmulo de óleo/lipídio é útil nos métodos da presente invenção. Li et al. descreve as culturas *Chlorella vulgaris* com até 56,6% de lipídio em peso seco de células (DCW) em culturas estacionárias cultivadas sob condições autotróficas usando concentrações de ferro (Fe) (Li et al., *Bioresource Technology* 99(11):4717-22 (2008). Rodolfi et al. descreve as culturas de *nanochloropsis sp.* e *Chaetoceros calcitrans* com 60% de lipídios DCW e 39,8% de lipídios DCW respectivamente, cultivadas em um fotobioreator em condições de falta de nitrogênio (Rodolfi et al., *Biotechnology & Bioengineering* (2008) [Jun 18 Epub ahead of print]). Solovchenko et al. descreve culturas *Parietochloris incise* com aproximadamente 30% de acúmulo de lipídios (DCW), quando cultivada fototropicamente e sob condições de nitrogênio (Solovchenko et al., *Journal of Applied Phycology* 20:245-251 (2008). *Chlorella protothecoides* pode produzir até 55% de lipídios (DCW) cultivadas sob condições heterotróficas com falta de nitrogênio (Miao and Wu, *Bioresource Technology* 97:841-846 (2006). Outras espécies de *Chlorella* incluindo *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella minutissima* foram descritas por ter acumulado até 63% de óleo (DCW), quando cultivado em biorreatores tanque agitados sob condições de baixo nitrogênio (Illman et al. *Enzyme and Microbial Technology* 27:631-635 (2000). O acúmulo de lipídios ainda maior por peso seco de célula foram relatados, incluindo 70% de lipídios (DCW) em culturas *Dumaliella tertiolecta* cultivadas em condições de NaCl (Takagi et al, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(3): 223-226 (2006)) e acúmulo de 75% de lipídios em culturas *Botryococcus braunii* (*Critical Reviews in Biotechnology* 22(3): 245-279 (2002)).

[00232] Estes e outros aspectos e modalidades da invenção são ilustrados, mas não limitados, pelos exemplos abaixo. Os exemplos também destacam as vantagens dos métodos da invenção.

IV. EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Cultivo de Microalgas para Atingir Alto Teor de Óleo

[00233] As cepas de microalgas foram cultivadas para atingir uma alta porcentagem de óleo por peso de célula seca. Células criopreservadas foram descongeladas em temperatura ambiente, e 500 µL de células foram adicionadas a 4,5 ml de meio (4,2 g/L de K_2HPO_4 , 3,1 g/L de NaH_2PO_4 , 0,24 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 g/L de ácido cítrico monoidratado, 0,025 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 g/L de extrato de levedura) mais glicose a 2% e crescidas 7 dias a 28°C com agitação (200 rpm) em uma placa de 6 poços. Os pesos secos de células foram determinados por centrifugação de 1 ml da cultura a 14.000 rpm por 5 minutos em um tubo Eppendorf pré-pesado. O sobrenadante de cultura foi descartado e o pélete de células resultante foi lavado com 1 ml de água deionizada. A cultura foi centrifugada novamente, o sobrenadante descartado e os péletes de células colocados a -80°C até congelamento. As amostras foram então liofilizadas por 24 horas e os pesos secos de células foram calculados. Para a determinação de lipídios totais nas culturas, 3 ml da cultura foram removidos e submetidos a análise usando um sistema Ankom (Ankom Inc., Macedon, NY) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram submetidas à extração por solvente com um extrator Ankom XT10 de acordo com o protocolo do fabricante. O lipídio total foi determinado como a diferença de massa entre as amostras secas hidrolisadas com ácido e as amostras secas, extraídas com solvente. As medições percentuais de peso de células secas do óleo são mostradas abaixo na tabela 5.

Tabela 5. Cultivo de microalgas para atingir alto teor de óleo.

Éspecies	Cepa	% de Óleo	SEQ ID NO:
Chlorella kessleri	UTEX 397	39,42	4
Chlorella kessleri	UTEX 2229	54,07	5
Chlorella kessleri	UTEX 398	41,67	6
Parachlorella kessleri	SAG 11.80	37,78	7
Parachlorella kessleri	SAG 14.82	50,70	8
Parachlorella kessleri	SAG 21.11 H9	37,92	9
Prototheca stagnora	UTEX 327	13,14	10
Prototheca moriformis	UTEX 1441	18,02	11
Prototheca moriformis	UTEX 1435	27,17	12
Chlorella minutissima	UTEX 2341	31,39	13
Chlorella protothecoides	UTEX 250	34,24	1
Chlorella protothecoides	UTEX 25	40,00	2
Chlorella protothecoides	CCAP 211/8D	47,56	3
Chlorella sp.	UTEX 2068	45,32	14
Chlorella sp.	CCAP 211/92	46,51	15
Chlorella sorokiniana	SAG 211.40B	46,67	16
Parachlorella beijerinckii	SAG 2046	30,98	17
Chlorella luteoviridis	SAG 2203	37,88	18
Chlorella vulgaris	CCAP 211/11K	35,85	19
Chlorella reisiigii	CCAP 11/8	31,17	20
Chlorella ellipsoidea	CCAP 211/42	32,93	21
Chlorella saccharophila	CCAP 211/31	34,84	22
Chlorella saccharophila	CCAP 211/32	30,51	23

Cultivo de *Chlorella protothecoides* para atingir alto teor de óleo

[00234] Três processos de fermentação foram realizados com três diferentes formulações de meios com o objetivo de gerar biomassa de algas com alto teor de óleo. A primeira formulação (Meio 1) baseou-se no meio descrito em Wu et al. (1994 *Science in China*, vol. 37, No. 3, pp. 326-335) e consistiu em KH_2PO_4 , 0,7 g; K_2HPO_4 , 0,3 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3mg, hidrocloreto de tiamina, 10 µg; glicose,

20g; glicina, 0,1 g; H_3BO_3 , 2,9mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,8mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 220 μg ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 80 μg e $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22,9mg : por litro. O segundo meio (Meio 2) foi obtido a partir do Meio meio do frasco descrito no exemplo 1 e consistiu em K_2HPO_4 , 4,2g; NaH_2PO_4 , 3,1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,24 g; ácido cítrico monoidratado, 0,25 g; cloreto de cálcio desidratado, 25mg; glicose, 20g; extrato de levedura, 2g : por litro. O terceiro meio (Meio 3) foi um híbrido e consistiu em K_2HPO_4 , 4,2g; NaH_2PO_4 , 3,1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,24 g; ácido cítrico, 0,25 g; cloreto de cálcio desidratado, 25mg; glicose, 20g; extrato de levedura, 2g; H_3BO_3 , 2,9mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,8 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 220 μg ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 80 μg e $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22,9mg : por litro. Todas as três formulações de meios foram preparadas e esterilizadas em autoclave em vasos de fermentador em escala de laboratório durante 30 minutos a 121°C. A glicose estéril foi adicionada em cada vaso seguindo o resfriamento após esterilização em autoclave.

[00235] O inóculo para cada fermentador foi *Chlorella protothecoides* (UTEX 250), preparado em dois estágios de frasco usando o meio e as condições de temperatura do fermentador inoculado. Cada fermentador foi inoculado com cultura de log-Mid (fase logaritmica do meio) 10% (v/v). Os três fermentadores de escala de laboratório foram mantidos a 28°C para a duração do experimento. O crescimento de células de microalgas no Meio 1 também foi avaliado a uma temperatura de 23°C. Para todas as avaliações de fermentadores, o pH foi mantido em 6,6 a 6,8, as agitações de 500rpm e fluxo de ar em 1 vvm. As culturas de fermentação foram cultivadas por 11 dias. A acumulação de biomassa foi medida por densidade óptica a 750 nm e peso de células secas.

[00236] A concentração de lipídio/óleo foi determinada usando a transesterificação direta com métodos de cromatografia de gás padrão. Resumidamente, as amostras de caldo de fermentação de biomassa foram manchadas em papel blot e transferidas para tubos de centrífuga

e secas em estufa a vácuo a 65 a 70°C por 1 hora. Quando as amostras foram secas, 2 ml de H₂SO₄ a 5% em metanol foram adicionados aos tubos. Os tubos foram, então, aquecidos em um bloco de aquecimento a 65 a 70°C por 3,5 horas, enquanto sendo agitados em vortex e sônicoados intermitentemente. 2 ml de heptano foram então adicionados e os tubos foram agitados vigorosamente. 2ml de K₂CO₃ a 6% foram adicionados e os tubos foram agitados vigorosamente para misturar e então centrifugados a 800rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi então transferido para recipientes GC contendo agente de secagem de Na₂SO₄ e foi executado usando métodos padrões de cromatografia de gás. O percentual de óleo/lipídio foi baseado em uma base de peso de células secas. Os pesos secos das células para células crescidas usando: Meio 1 a 23°C foi 9,4g/L; Meio 1 a 28°C foi 1,0 g/L, Meio 2 a 28°C foi 21,2g/L; e Meio 3 a 28°C foi 21,5g/L. A concentração de lipídio/óleo para células crescidas usando: Meio 1 a 23°C foi 3g/L; Meio 1 a 28°C foi 0,4 g/L; Meio 2 a 28°C foi de 18 g/L; e Meio 3 a 28°C foi 19g/L. O percentual de óleo com base no peso de células secas para células crescidas usando: Meio 1 a 23°C foi de 32%; Meio 1 a 28°C foi de 40%; Meio 2 a 28°C foi de 85% e Meio 3 a 28°C foi de 88%. O perfil lipídico (em % de área, após a normalização para o padrão interno) para a biomassa de algas gerados usando as três diferentes formulações de meio a 28°C encontram-se resumidas abaixo na tabela 6.

Tabela 6. Perfil lipídico de *Chlorella protothecoides* crescida sob diferentes condições de meio.

	Média 1 a 28°C (em % de Area)	Média 2 a 28°C (em % de Area)	Média 3 a 28°C (em % de Area)
C14:0	1,40	0,85	0,72
C16:0	8,71	7,75	7,43
C16:1	--	0,18	0,17
C17:0	--	0,16	0,15

	Média 1 a 28°C (em % de Area)	Média 2 a 28°C (em % de Area)	Média 3 a 28°C (em % de Area)
C17:1	--	0,15	0,15
C18:0	3,77	3,66	4,25
C18:1	73,39	72,72	73,83
C18:2	11,23	12,82	11,41
C18:3 alpha	1,50	0,90	1,02
C20:0	--	0,33	0,37
C20:1	--	0,10	0,39
C20:1	--	0,25	--
C22:0	--	0,13	0,11

Levedura de culturas oleaginosas para atingir alto teor de óleo

[00237] A cepa de Levedura *Rhodotorula glutinis* tensão (DSMZ-DSM 70398) foi obtida a partir do Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (Coleção Alemã de Microorganismos e Cultura de Células, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemanha. As células criopreservadas foram descongeladas e adicionadas a 50 mL de meio YPD (descrito acima) com uma solução vitamina DAS 1x (1000x: 9g/L tricina; 0,67g/L de tiamina-HCl; 0,01 g/L d-biotina; 0,008 cianocobalamina; 0,02 pantotenato de cálcio e 0,04 g/L de ácido p-aminobenzóico) e crescidas a 30°C com 200 rpm de agitação por 18-24 horas, até que uma leitura OD foi mais de 5 OD (A600). A cultura foi então transferida para fermentadores 7 L- e trocada para o meio YP1 (8,5 g/L de base nitrogenada para levedura Difco sem aminoácidos e sulfato de amônio, 3 g/L de Sulfato de Amônio, 4 g/L de extrato de levedura) com solução de vitamina DAS 1x. As culturas foram amostradas duas vezes por dia e ensaiadas para OD (A600), peso seco de célula (DCW) e concentração de lipídios. Quando as culturas atingiram mais de 50g/L de DCW, as culturas foram colhidas. Baseado no peso seco da célula, a biomassa de levedura continha aproximadamente 50% de óleo. Duas

amostras de biomassa de levedura foram submetidas a transesterificação direta e analisadas através de GC/FID para um perfil lipídico. Os resultados são expressos em percentual de área e mostrados na tabela 7, abaixo.

Tabela 7. Perfil lipídico de amostras de biomassa de levedura transesterificada.

	C10:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3α	≥C:20
Amostra 1	0,03	0,21	3,36	0,25	33,26	0,76	0,20	6,88	42,68	9,28	1,33	1,1
Amostra 2	0,02	0,10	2,18	0,12	29,94	0,49	0,16	8,17	48,12	7,88	0,84	1,45

Cultivo de *Rhodococcus opacus* para atingir alto teor de óleo

[00238] A cultura de sementes de *Rhodococcus opacus* PD630 (DSM 44193, Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH) foi gerada usando 2ml de um estoque crio-preservedo inoculado em 50 ml de meio MSM com sacarose a 4% (vide Schlegel, et al., (1961) *Arch Mikrobiol* 38, 209-22) em um frasco defletor 250 ml. A cultura de semente foi crescida a 30°C com 200 rpm de agitação até atingir uma densidade óptica de 1,16 a 600 nm. 10ml do frasco com semente foram usados para inocular culturas para a produção de lipídios sob duas condições diferentes de nitrogênio: NH₄Cl 10mM e NH₄Cl 18,7 mM (cada um em duplicata). As culturas de crescimento das foram crescidas a 30°C com 200 rpm de agitação por 6 dias. As células cresceram na condição de NH₄Cl 10 mM atingiram um máximo de 57,2% de lipídios (média) por DCW após 6 dias de cultura. As células crescidas na condição de NH₄Cl 18,7 mM atingiram um máximo de 51,8% de lipídios (média) por DCW após 5 dias em cultura.

[00239] Uma amostra de biomassa de *Rhodococcus opacus* foi submetida a transesterificação direta e analisada através de GC/FID para um perfil lipídico. Os resultados foram: C14: 0 (2,33); C15: 0 (9,08); C16: 0 (24,56); C16: 1 (11,07); C17: 0 (10,50); 2 ligações duplas equivalentes (2DBE) C17 espécies (19,90); C18: 0 (2,49); C18: 1 (17,41); C18: 2 (0,05); C19: 0 (0,75) e 2DBE C19 espécies (1,87).

EXEMPLO 2

Diversidade de Cadeias Lipídicas em Espécies de microalgas

[00240] As amostras de Lipídios de um subconjunto de cepas crescidas no exemplo 1, e listadas na tabela 5, foram analisadas para o perfil lipídico usando HPLC. Os resultados são mostrados abaixo na tabela 8.

Tabela 8. Diversidade de cadeias de lipídicas em espécies de microalgas.

Cepa de Microalga	C:14:0	C:16:0	C:16:1	C:18:0	C:18:1	C:18:2	C:18:3	C:20:0	C:20:1
<i>C. protothecoides</i> (UTEX 250)	0,57	10,30	0	3,77	70,52	14,24	1,45	0,27	0
<i>C. protothecoides</i> (UTEX 25)	0,61	8,70	0,30	2,42	71,98	14,21	1,15	0,20	0,24
<i>C. kessleri</i> (UTEX 397)	0,68	9,82	0	2,83	65,78	12,94	1,46	0	0
<i>C. kessleri</i> (UTEX 2229)	1,47	21,96	0	4,35	22,64	9,58	5,2	3,88	3,3
<i>Prototheca stagnora</i> (UTEX 327)	0	12,01	0	0	50,33	17,14	0	0	0
<i>Prototheca moriformis</i> (UTEX 1441)	1,41	29,44	0,70	3,05	57,72	12,37	0,97	0,33	0
<i>Prototheca moriformis</i> (UTEX 1435)	1,09	25,77	0	2,75	54,01	11,90	2,44	0	0

EXEMPLO 3**Biomassa de Microalgas para Secagem em Tambor**

[00241] Um lote de tanque-F de *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) (cerca de 1.200 galões) foi usado para gerar biomassa para processos de extração. O lote foi deixado executar por aproximadamente 100 horas, enquanto controlando os níveis de glicose a 16 g/L, após o que o alimento de xarope de milho foi terminado. Os níveis de glicose residual caíram aproximadamente 0 g/L duas horas depois. O volume de caldo final foi de 4.239 litros (1.120 galões). Tanto as checagens de contaminação em processo quanto uma análise de uma amostra de caldo final não mostraram quaisquer sinais de contaminação. A biomassa de microalgas continha 38% de óleo com base no peso seco da célula (DCW).

[00242] A biomassa de microalgas foi então seca em um secador de tambor duplo atmosférico. O caldo foi alimentado através de um bocal nos dois tambores aquecidos a vapor que foram voltados em contra-rotação um com o outro. O caldo foi mecanicamente espalhado pela ação dos tambores contra-rotativos em folhas finas divididas em ambos os cilindros quentes. As folhas finas aderentes do caldo foram rapidamente secas condutivamente pelo alto fluxo de calor do vapor de condensação do no interior dos tambores. A pressão de vapor variou de 411,6 a 825,3 Kpa (45 a 105 psig) e a velocidade de rotação do tambor foi ajustada para entre 2 a 20 rpm. O teor de umidade da biomassa após a secagem em tambor estava entre 30 a 10% (em peso).

Biomassa microbiana condicionada em calor

[00243] *Chlorella protothecoides* foi produzida e seca em tambor usando os métodos descritos no exemplo 6. A biomassa de microalgas seca em Tambor de foi condicionada em calor usando um condicionador empilhado na vertical de quatro decks (modelo 424, empresa French Oil Mill Machinery, Piqua, Ohio). Cada plataforma mantém até 2,8 metros

cúbicos de material. O condicionador empilhado na vertical foi preaquecido usando 411,6 a 790,8 Kpa (45 a 100 psig) de vapor por cerca de uma hora antes de condicionamento de calor da biomassa. Depois do preaquecimento, a biomassa de microalgas foi carregada no plataforma do topo do condicionador empilhado na vertical e guiada para uma calha de transporte que leva ao próximo plataforma abaixo por um braço limpador em cada plataforma, que foi montado em um eixo vertical comum energizado por um motor elétrico. A carga de 68 Kg (150 libras) de biomassa de microalgas seca em tambor encheu o condicionador vertical, e para assegurar condicionamento de calor uniforme, a biomassa foi circulada pela abertura da válvula gaveta de descarga do fundo do condicionador empilhado na vertical e retorno da biomassa para o topo do condicionador vertical. A temperatura da biomassa em cada plataforma foi monitorada e controlada entre 82,2 a 121,1°C (180 e 250°F), a fim de evitar queimar. Os tempos de residência de condicionamento de calor foram variou de 10 a 60 minutos para obter biomassa de teor de umidade variada. A biomassa condicionada em calor foi descarregada em carretas cobertas com polietileno e imediatamente pressionada em uma prensa de oleaginosa. As amostras de biomassa antes e depois do condicionamento de calor foram analisadas para umidade e teor de óleo.

Extração de Óleo de Microalgas usando um Taby Pressen de Bancada

[00244] A biomassa de *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) seca em tambor feita de acordo com os métodos acima foi seca tal que o teor de umidade resultante foi de cerca de 5-5,5%. A biomassa de microalgas continha 48,5% de óleo com base no peso seco da célula (DCW). A biomassa foi alimentada através de uma prensa de óleo tipo Pressen Taby 70 com um motor de 2.2 Hp e diâmetro de rosca de 70mm. A prensa foi preaquecida a uma temperatura de cilindro de 100°C. Nenhum óleo foi extraído sob essas condições. Outra execução

de prensa foi realizada usando o mesmo lote de biomassa seca em tambor com a umidade ajustada para baixo de 0,5% de umidade em peso, usando uma estufa de ar forçado a 70°C por 30 minutos como uma etapa de condicionamento antes de alimentá-la na prensa. O cilindro de prensa foi aquecido a 82°C e a biomassa de microalgas condicionada, seca em tambor foi alimentada através da prensa de bancada. Aproximadamente 68% do óleo disponível (em peso) foi recuperado e a torta prensada, ou biomassa gasta, foi então extraído do solvente para recuperar o óleo residual. Depois de vários experimentos com biomassa de microalgas de teores de óleo variados (entre 40-55% de óleo DCW), a torta prensada tinha cerca de 30% de óleo, medido por métodos analíticos a cada vez.

[00245] O método analítico para determinação do percentual de lipídio/óleo em uma amostra foi baseada em um método de Soxhlet modificado. Resumidamente, 1 grama de amostra foi pesado e submetido à hidrólise ácida seguido por extração por solvente com éter de petróleo. Tanto a hidrólise ácida quando a extração com éter de petróleo foi acelerada pelo calor usando o sistema de reação acelerada em Microondas MARS. O solvente de éter de petróleo foi então evaporado e da quantidade de lipídio extraída foi determinada por gravimetria.

Extração por solventes em Pequena Escala

[00246] A torta prensada gerado a partir da prensa de bancada foi extraído por solvente para recuperar o óleo residual. O excesso de éter de petróleo foi adicionado aa torta prensada (5:1 peso por volume) e misturado por um mínimo de uma hora em temperatura ambiente. A mistura de éter de petróleo foi, então, passada através de um funil de Buchner contendo um filtro de 5 µm. Os sólidos foram coletados do filtro e, então, submetidos a 3 lavagens adicionais com éter de petróleo de 2x de volume cada um. A mistura de éter de petróleo filtrada e as

lavagens foram agrupadas (pooled) e colocadas em um RotoVap (2 L) para destilar o éter de petróleo. O óleo remanescente foi coletado e pesado. Mediante a inspeção microscópica da torta de éter de petróleo extraída, não houve nenhum óleo livre detectado na torta depois da extração de éter de petróleo. No entanto, vesículas lipídicas ainda foram vistas em células de algas intactas (não quebradas). Este método irá recuperar 100% do óleo livre na torta prensada, mas não nas células das algas intactas. Este processo de extração por solvente em pequena escala pode ser usado para determinar a eficácia de uma prensa expelidora na quebra ou fissura de células de algas.

EXEMPLO 4

Extração de óleo de Microalgas Usando uma Prensa Komet de escala de Laboratório

[00247] Trinta (30) quilogramas de biomassa de microalgas *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) seca em tambor contendo cerca de 48% de óleo por DCW com teor de umidade de cerca de 5% foram executados através de uma prensa de oleaginosas de Komet com um diâmetro 65 mm em uma etapa de condicionamento de pré-prensa com o cone de descarga completamente desengatado. Nos termos dessa condição de pré-prensa de baixa pressão, nenhum óleo foi liberado, no entanto, a biomassa de microalgas seca foi convertida a partir de flocos soltos em péletes pré-prensados. A figura 2a mostra o material de biomassa seca em tambor que foi colocado pela prensa. A figura 2b mostra os péletes pré-prensados. Os péletes pré-prensados foram coletados e executados através da mesma prensa mediante condições de prensa completa com o cone de descarga completamente engatado para a máxima pressão. O resultado foi uma recuperação de 69% do óleo do péletes.

[00248] A torta gasta da prensa foi então submetido à extração por solvente usando iso-hexano em um extrator tipo percolação. A extração

com iso-hexano rendeu 1 kg adicional de óleo. A combinação da pressagem condicionada seguido pela extração com hexano recuperou um total de 76% do total de óleo disponível a partir da biomassa de microalgas seca. Estes resultados são resumidos na tabela 9 abaixo.

Tabela 9. Resumo dos resultados da execução com prensa de Komet.

Biomassa Total	30 Quilogramas
Percentual de óleo (DCW)	48%
Óleo total disponível por peso	14,4 Quilogramas
Óleo virgem recuperado (pressagem condicionada)	10 Quilogramas
% Óleo Recuperado por Pressagem	69%
Óleo Disponível por Peso após Pressagem	4,4 Quilogramas
% de Óleo Recuperado da Extração com Hexano	23% de óleo disponível da torta prensada (aprox. 1 quilograma de óleo)
Percentual Total de Óleo Recuperado	76%

EXEMPLO 5

Prensagem em Escala Piloto de Microalgas Usando um Auxiliador de Prensa

[00249] A biomassa de microalgas (*Chlorella protothecoides* UTEX 250) contendo 38% de óleo por DCW foi seca usando um secador de tambor com um teor de umidade resultante de cerca de 3,5% (como medido por um analisador de umidade). Uma prensa de rosca de oleaginosas em escala piloto francesa L-250 (*8,9 cm (3,5") de diâmetro) (empresa French Oil Mill Machinery, Piqua, Ohio) foi usada nos experimentos seguintes. O cilindro do núcleo principal (ou gaiola) tinha um diâmetro de 8,9 cm (3,5 polegadas). A rosca consistia em alternar roscas sem-fim e colares configurados para uma taxa de compressão de 7 a 18. O acionador principal foi alimentado por um motor elétrico de 20 cv e a velocidade de rotação do eixo principal foi de

20 rpm. A gaiola e o eixo foram pré-aquecidos entre 82,2 a 126,6°C (180°F e 260°F) pelo uso de vapor indireto. A folga do cone de 1,3 cm (0,5 polegadas), medida entre o suporte de cone e a placa de montagem de cone foi usada. A folga do cone foi ajustado usando as válvulas direcionais de 3 posições e a bomba de mão do cilindro de cone hidráulico.

[00250] O painço amarelo (*Panicum virgatum*) seco foi usado como um auxílio de prensa para microalgas. A biomassa de algas seca em tambor de 38% de óleo de DCW foi misturada com painço amarelo para formar amostras de 20% de painço amarelo/biomassa, 5% de painço amarelo/biomassa, ou apenas biomassa. Todas as três amostras biomassa de algas foram separadamente condicionadas em calor em um condicionador empilhado na vertical (como descrito acima) por 30 minutos a 121°C. A prensa foi aquecida a uma temperatura de cilindro de 93°C antes da adição da biomassa. Aproximadamente 39,5% do óleo total disponível (em peso) foram recuperados pressionando os 20% de painço amarelo/biomassa e também rendeu uma boa qualidade de torta prensada para extração com hexano. Aproximadamente 25% do óleo total disponível (em peso) foram recuperados a partir da prensagem de 5% de painço amarelo/biomassa e também rendeu uma torta prensada de boa qualidade para a extração com hexano. A condição de biomassa apenas rendeu recuperação de óleo mais baixa, de cerca de 5% do óleo total (em peso), e a torta prensada foi de qualidade inferior para extração com hexano.

[00251] Cascas de soja também foram usadas como um auxílio de prensa com microalgas. A biomassa de algas seca em tambor de 38% de óleo de DCW foi misturada com as cascas de soja para formar amostras com 20% de casca de soja/biomassa, 10% de casca de soja/biomassa ou de biomassa apenas. Todas as três amostras de biomassa de algas foram separadamente condicionadas em calor em

um condicionador empilhado na vertical por 30 minutos a 121°C. A prensa foi aquecida a uma temperatura de cilindro de 93°C antes da adição da biomassa. Os 20% da mistura de casca de soja/biomassa não alimentou através da prensa e, portanto, nenhum óleo foi recuperado. Aproximadamente 22,5% do óleo total disponível (em peso) foram recuperados da prensagem de 10% de casca de soja/biomassa também rendeu uma torta prensada de boa qualidade para extração com hexano. A condição de biomassa apenas não rendeu nenhum óleo e obstruiu o conjunto de rosca da prensa expelidora. Nas condições de 5%, 20% de painço amarelo e 10% de cascas de soja, houve cerca de 25% de sólidos em peso no óleo recuperado. Os resultados são resumidos na tabela 10 abaixo, que mostram o percentual total de óleo recuperado em peso com o peso dos sólidos subtraído.

Tabela 10. Prensagem de microalgas com o uso de auxílios de prensa.

Auxílio de Prensa	Percentual adicionado	% de óleo recuperado	Qualidade da torta prensada para ex-tração com solventes
Painço amarelo	0	~5%	Pobre
Painço amarelo	5%	24,9%	Bom
Painço amarelo	20%	39,5%	Bom
Cascas de soja	0	nenhum	N/A
Cascas de soja	10%	22,5%	Bom
Cascas de soja	20%	nenhum	N/A

EXEMPLO 6

Efeitos do Teor de Umidade na Recuperação de Óleo

[00252] A biomassa de algas de *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) de 38% de óleo de DCW foi seca em tambor de acordo com os métodos descritos no exemplo 3. O teor de umidade foi medido em aproximadamente 3 a 5% e não foi condicionado antes da alimentação na prensa de rosca. As 32,6 Kg (72 Libras) da biomassa foram alimentadas em prensa de semente oleaginosa de 8,9 cm (3,5")

(Empresa French Oil Mill, Piqua, OH) preaquecida a 93,3°C (200°F). Os sólidos ou a fundação pesada foram observados como sendo empurrados entre as barras da gaiola ao longo de todas as seções da prensa. Aproximadamente 5% de óleo foram recuperados (após os sólidos serem removidos). A extração por solvente da torta prensada recuperou um adicional de 58% do total de óleo disponível (aproximadamente 7 kg). A análise da torta extraída por solvente mostrou que havia aproximadamente 18,6% de óleo residual. A recuperação total (prensa e extração por solvente) de óleo foi de 62%, indicando que a prensa só quebrou ou lisou 62% das células de microalgas. A pobre recuperação de óleo (5%) e a fundação pesada que foram observadas indicou que as condições (por exemplo, teor de umidade da biomassa microbiana) não foram ideais.

[00253] Uma série de testes foi realizada para estabelecer uma faixa ótima de teor de umidade para a biomassa microbiana seca que renderia a recuperação mais alta de óleo em uma prensa expelidora. A biomassa de microalgas contendo 51,3% de óleo de DCW foi seca usando um secador de tambor. Uma prensa de semente oleaginosa francesa de 8,9 cm (3,5") (comparável à prensa francesa L250) foi usada e a configuração foi idêntica a descrito no exemplo 5. A biomassa de algas seca foi condicionada em calor em um condicionador empilhado na vertical a 121,1°C (250°F). O tempo de condicionamento de calor foi variado para atingir os diferentes níveis de teor de umidade. O cilindro de prensa foi preaquecido a e mantido a 93,3°C (200°F) durante todos os experimentos, salvo indicação em contrário. A biomassa de microalgas condicionada em calor foi introduzida aos poucos na prensa de oleaginosas, enquanto monitorando a carga elétrica de prensa. A taxa de alimentação foi controlada por um transportador de rosca de velocidade variável. A taxa de alimentação foi determinada pela adição dos pesos de óleo bruto e torta prensada

recolhidos ao longo de 2-3 minutos. As amostras de cada torta prensada de diferentes condições foram analisadas usando métodos analíticos descritos acima para medir o teor de lipídios/óleo.

[00254] Um segundo conjunto de experimentos foi feito com o mesmo lote de biomassa de microalgas seca em tambor como acima. Um lote de biomassa de microalgas foi condicionado no condicionador empilhado na vertical a 93,3°C (200°F) e teve um teor de umidade final de 1,2%. Outro lote de biomassa de microalgas foi condicionado no condicionador empilhado na vertical a 143,3°C (290°F) e teve um teor de umidade final de 0,7%. Ambos os lotes foram prensados na L250, prensa de oleaginosas com 8,9 cm (3,5") de diâmetro com temperatura de cilindro a 93,3°C (200°F). O lote com o teor de umidade de 1,2% rendeu 54,3% de recuperação de óleo (em peso), que é comparável com os resultados do lote acima de 1,2% de teor de umidade de biomassa, que rendeu 48,2% de recuperação de óleo. A condição de 0,7% de teor de umidade de produziu os melhores resultados, produzindo uma torta de boa qualidade para posterior extração por solvente e um rendimento de 73% de recuperação de óleo. No entanto, o óleo era ligeiramente mais escuro do que o óleo produzido a partir da biomassa que foi condicionada a 93,3°C (200°F). A Tabela 11 abaixo resume o teor de umidade de teste e o percentual de óleo recuperado (depois de subtrair os sólidos) a partir destes dois conjuntos de experimentos.

Tabela 11. Efeitos do teor de umidade no óleo recuperado.

Teor de umidade	% de óleo recuperado	% de óleo em torta prensada	Taxa de oleosidade (g/min)	Qualidade da torta prensada para extração por solvente
0,2%	49,1%	8%	355	Pobre em queima; pulverulento
1%	66,9%	29%	596	Bom
1,2%	48,2%	33%	518	Bom

Teor de umidade	% de óleo recuperado	% de óleo em torta prensada	Taxa de oleosidade (g/min)	Qualidade da torta prensada para extração por solvente
2,4%	34,9%	39%	277	Bom
1,2%; tempo de condicionamento 200°F	54,3%	32%	520	Bom
0,7%; tempo de condicionamento 290°F	73%	16%	697	Boa; Óleo ligeiramente mais escuro que o executado a 200°F

[00255] Os resultados destes dois conjuntos de experimentos indicaram que o teor de umidade ideal para atingir o percentual mais elevado de recuperação de óleo e uma torta prensada de boa qualidade para posterior extração por solvente neste Exemplo é entre 0,7% e 1,2%. Esta faixa de teor de umidade na biomassa de microalgas também produziu menos sólidos no óleo (menos de 25% em peso). Outros experimentos semelhantes mostraram que um teor de umidade abaixo de 0,5% resultou em depósito pesado (sólidos) no óleo (acima de 40% em peso), o que influencia o rendimento global, e produziu uma queima, pulverulência, torta de qualidade pobre que não foi adequado para posterior extração por solvente (vide figura 3a). A um teor de humidade maior que 1,2%, o rendimento global de óleo foi menor, mas a torta prensada produzida foi de muito boa qualidade para a posterior extração por solvente (vide figura 3b). Este resultado indica que o teor de umidade desempenha um papel importante na qualidade e textura da torta prensada a partir da biomassa microbiana, e há uma inibição do percentual de rendimento de óleo se o teor de umidade é muito elevado.

EXEMPLO 7

Prototheca em Prensa de Laboratório com um Perfil Lipídico de Materiais Prensados, Extraídos e Combinados

[00256] Aproximadamente 2 kg de biomassa de lagas de *Prototheca moriformis* seca em tambor com 60% de lipídios DCW foram pressionados usando um Press Taby tipo 70 de bancada (vide Exemplo 8 acima para as condições da prensa). A biomassa seca foi de condicionada em calor em uma estufa de ar forçado a 212°F por 30 minutos. A prensa foi preaquecida a 93,3°C (200°F) e 235,5 gramas de óleo foi recuperado (19%), após os sólidos serem removidos. O óleo foi colhido e analisado para o teor de perfil lipídico (expressa em % de área), clorofila e de carotenoide usando métodos padrões. O óleo residual na torta prensada foi recuperado através de um lote de extração com éter de petróleo (como descrito no exemplo 3). Um total de 311 gramas de óleo foi extraído de 961 gramas de torta prensada. O óleo extraído foi também analisado para o perfil lipídico (expresso em % de área), clorofila e carotenóides, que são resumidos a seguir. No geral, o teor de perfil lipídico, clorofila e de carotenóides a partir de óleo prensado e do óleo extraído com solvente foram muito semelhantes.

Tabela 12. Perfil lipídico de óleo extraído de *Prototheca moriformis*.

	Óleo prensado (% de Área)	Óleo extraído por solvente (% de Área)
C12:0	0,05	0,05
C14:0	1,36	1,37
C14:1	0,02	0,02
C15:0	0,04	0,04
C16:0	19,90	20,11
C16:1	0,85	0,85
C18:0	4,11	4,15
C18:1	64,81	64,56
C18:2	7,83	7,83
C20:0	0,03	0,03

Tabela 13. Teor de Carotenoide e Clorofila no Óleo Extraído de *Prototheca moriformis*.

	Óleo Prensado (mcg/ml)	Óleo Extraído por Solvente (mcg/ml)
cis-Luteína	0,041	0,042
trans-Luteína	0,140	0,112
trans-Zeaxantina	0,045	0,039
cis-Zeaxantina	0,007	0,013
t-alpha-Criptoxantina	0,007	0,010
t-beta-Criptoxantina	0,009	0,010
t-alfa-Caroteno	0,003	0,001
c-alfa-Caroteno	Nenhum detectado	Nenhum detectado
t-beta-Caroteno	0,010	0,009
9-cis-beta-Caroteno	0,004	0,002
Licopeno	Nenhum detectado	Nenhum detectado
Total de Carotenóides	0,267	0,238
Clorofila	<0,01 mg/kg	<0,01 mg/kg

[00257] Além disso, a análise elementar também foi realizada em óleo prensado e óleo extraído por solvente de *Prototheca moriformis* usando espectrometria de massa ICP. Os resultados estão resumidos abaixo na tabela 14.

Tabela 14. Análise elementar do óleo extraído de *Prototheca moriformis*.

	Óleo prensado (ppm)	Óleo Extraído por Solvente (ppm)
Lítio	<2	<2
Berílio	<2	<2
Boro	<2	<2
Sódio	12	12
Magnésio	<2	2
Alumínio	8	8
Fósforo	<2	<2
Potássio	12	26

	Óleo prensado (ppm)	Óleo Extraído por Solvente (ppm)
Cálcio	11	<2
Escândio	<2	<2
Titânio	<2	<2
Vanádio	<2	<2
Cromo	<2	<2
Manganês	<2	<2
Ferro	<2	<2
Cobalto	<2	<2
Níquel	<2	<2
Cobre	<2	<2
Zinco	<2	<2
Gálio	<2	<2
Germânio	<2	<2
Arsênico	<2	<2
Selênio	<2	<2
Rubídio	<2	<2
Estrôncio	<2	<2
Ítrio	<2	<2
Zircônio	<2	<2
Nióbio	<2	<2
Molibdênio	<2	<2
Rutênio	<2	<2
Ródio	<2	<2
Paládio	<2	<2
Prata	<2	<2
Cadmio	<2	<2
Índio	<2	<2
Estanho	<2	<2
Antimônio	<2	<2
Telúrio	<2	<2
Césio	<2	<2

	Óleo prensado (ppm)	Óleo Extraído por Solvente (ppm)
Bário	<2	<2
Lantânio	<2	<2
Cério	<2	<2
Praseodímio	<2	<2
Neodímio	<2	<2
Samário	<2	<2
Európio	<2	<2
Gadolínio	<2	<2
Térbio	<2	<2
Disprósio	<2	<2
Hólmio	<2	<2
Erbio	<2	<2
Túlio	<2	<2
Itérbio	<2	<2
Lutécio	<2	<2
Hafnio	<2	<2
Tântalo	<2	<2
Tungstênio	<2	<2
Rênio	<2	<2
Írídio	<2	<2
Platina	<2	<2
Ouro	<2	<2
Tálio	<2	<2
Chumbo	<2	<2
Bismuto	<2	<2
Tório	<2	<2
Urânio	<2	<2
Iodo	28	<4
Enxofre (ICP)	<5	<5
Mercúrio	<2	<2
Cloro	<8	<6

EXEMPLO 8**Prensagem em Escala Piloto de *Prototheca moriformis***

[00258] *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) contendo aproximadamente 66% do óleo (em peso de células secas) foi seca em tambor usando os métodos descritos no exemplo 3. Após a secagem em tambor, o teor de umidade da biomassa foi de cerca de 2,7%. A biomassa seca foi, então, condicionada em calor usando os métodos descritos no exemplo 3. O teor de umidade da biomassa após condicionamento em calor foi de cerca de 0,6-1,4%. A biomassa de algas foi então alimentada em uma prensa de rosca de semente oleaginosa de 8,9 cm (3,5") (French Oil Mill French Oil Mill Company, Piqua OH, Piqua OH) com a gaiola preaquecida a 90,5 a 104,4°C (195-220°F). O depósito pesado foi observado como sendo empurrado entre as barras da gaiola, o que indica que as condições não eram ideais. Aproximadamente 47,9% de óleo (baseado no peso e cálculo teórico de óleo disponível na biomassa) foram recuperados com finos (sólidos). Os sólidos foram removidos por centrifugação e o rendimento total de óleo foi de 31,9% após clarificação. A análise da torta prensada mostrou que havia cerca de 22% (em peso da torta prensada) de óleo residual. Outro lote de biomassa que foi similarmente preparado também foi executado através da prensa com rendimento semelhante na recuperação de óleo (57,3% incluindo sólidos no óleo).

EXEMPLO 9**Uso de Auxílios de Prensa com Extração de Óleo de *Prototheca moriformis***

[00259] Uma série de testes foi realizada com diferentes auxílios de prensa no Press Taby de bancada em escala de laboratório, a fim de verificar se a adição de um auxílio de prensa pode aumentar os rendimentos do óleo. Os diferentes auxílios de prensa foram adicionados ao caldo de fermentação após a colheita da biomassa. O

auxílio de prensa/biomassa foi então seco junto em um secador de tambor e, em seguida, condicionado em calor. Esta mistura de auxílio de prensa/biomassa foi então alimentada em um Press Taby escala de escala de laboratório sob as condições acima descritas no exemplo 3. A condição com nenhum auxílio de prensa adicionado foi usada como controle negativo.

[00260] Para o controle negativo, 3L de caldo de fermentação contendo biomassa com 63,4% de óleo foram secos em um secador de tambor. A biomassa seca foi alimentada através da prensa de bancada e rendeu quantidade mínima de óleo. A condição seguinte foi 3L de caldo de fermentação com 150g (5% em peso úmido do caldo de fermentação) de auxílio de filtro celulósico (Pb20, EP Minerals, Nevada). A mistura foi então seca em um secador de tambor e teve um teor de umidade de 2,25%, após secagem em tambor. A celulose/biomassa foi, então, condicionada em calor em um forno de 110°C por 20-30 minutos, para um teor de umidade final de 1,2%. Esta celulose/biomassa condicionada foi então alimentada à prensa de escala de laboratório. Baseado em cálculos teóricos de óleo disponível, houve aproximadamente 145 gramas de óleo disponível na biomassa. Aproximadamente 148 gramas de óleo foram recuperadas usando a prensa de escala de laboratório, tornando a recuperação total de óleo de cerca de 100%.

[00261] O próximo condicionado testado foi a adição de 5% de cascas de soja moídas grossas (em peso úmido). 150 gramas de casca de soja foram misturadas com 3L de caldo de fermentação contendo biomassa de *Prototheca moriformis*. Durante o processo de mistura, foi observado que as cascas de soja moídas grossas tendem a decantar para fora da solução, assim a mistura constante era necessária. A mistura foi então seca no secador de tambor e teve um teor de umidade de 6,5%, após secagem tambor. A casca de soja/biomassa seca foi,

então, condicionada em calor em uma estufa de 110°C por 20-30 minutos para um teor de umidade final de 2,5%. A casca de soja/biomassa condicionada em calor foi então alimentada através da prensa de rosca de escala de laboratório. Fora do 162 gramas de óleos disponíveis calculados, 46 gramas de óleo foram recuperados a partir da prensa de rosca em escala de laboratório, tornando a recuperação total de óleo em 28%. Estes experimentos foram repetidos com outro lote de caldo de fermentação de *Prototheca moriformis* e 2% de cascas de soja moídas grossas adicionados, 1% de casca de soja adicionado, 2% de celulose adicionado e 1% de celulose adicionado. Um controle negativo com caldo de fermentação seco em tambor apenas também foi testado. A quantidade mínima de óleo foi recuperada a partir do controle negativo. Da condição de 2% de casca de soja, 42% do óleo disponível foram recuperados e 30% do óleo disponível foram recuperados a partir da condição de 1% de casca de soja. Da condição de 2% de celulose, 40% do óleo disponível foram recuperados e 10% do óleo disponível foram recuperados a partir da condição 1% de celulose .

[00262] Experimentos adicionais foram realizados usando cascas de soja finamente moídas e adições de material seco ao caldo de fermentação como o auxílio de prensa. Devido às cascas de soja moídas grossas terem a tendência a decantar, as cascas de soja moídas grossas foram finamente moídas usando um moedor de café sobre o decantado mais fino. Após a moagem, a casca de soja finamente moída tinha uma textura em pó. O material seco (2x torta prensada de biomassa de *Prototheca moriformis* tendo teor 5% de óleo) também foi moído para este experimento. A condição controle foi biomassa de *Prototheca moriformis* com cerca de 60% de óleo, sem adição de auxílio de prensa. 150 gramas de cascas de soja finamente moídas (5%) ou material seco moído (5%) foram adicionados a 3 L de caldo de fermentação contendo biomassa de *Prototheca moriformis*. A

biomassa de algas e mistura de auxílio de prensa foram então secas em um secador de tambor. A condição controle (biomassa de *Prototheca moriformis* apenas) tinha um teor de umidade de 4% após a secagem em tambor, a condição de casca de soja finamente moída 5% teve um teor de umidade de 2,3%, após secagem em tambor e a condição de 5% de material seco teve um teor de umidade de 2,5% após secagem em tambor. Cada uma das biomassas foi então seca em uma estufa a 110°C por 20 a 30 minutos para a condição de aquecimento da biomassa. O teor de umidade final para o controle de biomassa foi de 2%, o teor de umidade final para a adição de 5% de casca de soja finamente moída foi de 1,3% e o teor de umidade final para a adição de 5% do material seco foi de 1,01%. Após o condicionamento em calor, cada uma das biomassas foi então alimentada através de uma prensa de rosca Taby de escala de laboratório nas condições acima descritas no exemplo 3. O óleo extraído e a torta prensada foram coletados e analisados para um rendimento estimado. Para a condição de controle, 6,7grams de óleo foram coletados (após a remoção de sólidos do óleo), para um rendimento aproximado de 2,8%. O depósito pesado foi observado através da prensa e da torta prensada obstruiu a extremidade de descarga da prensa. Na condição de 5% de casca de soja finamente moída, 148,2 gramas de óleo foram coletados (após a remoção de sólidos a partir do óleo), para um rendimento aproximado de recuperação de 79,2%. Houve uma quantidade mínima de fundamento durante a prensagem e quantidades muito baixas de sólidos estavam no óleo prensado antes da clarificação. Na condição de 5% de material seco adicionado, 195,9g de óleo foram coletados (após a remoção de sólidos a partir do óleo), para um rendimento aproximado de 54,6%. Houve uma quantidade mínima de fundamento durante a prensagem e pequenas quantidades de sólidos estavam no óleo prensado antes da clarificação. Estes resultados são consistentes com

os resultados acima, onde a adição de auxílios de prensa ao caldo de fermentação (contendo biomassa de microalgas), seguido pela cossecagem em um secador de tambor produziu biomassa, que teve um rendimento de óleo aumentado quando prensado sobre uma prensa de rosca, em comparação com a biomassa de microalgas com nenhum auxílio de prensa adicionado.

Prensagem de Escala Piloto de *Prototheca moriformis* Usando um Auxílio de Prensa

[00263] Os testes em escala de planta piloto foram realizados para avaliar cascas de soja moídas solo como auxílios de prensa quando seca misturando com a biomassa de microalgas de *Prototheca moriformis* seca em tambor. As cascas de soja moídas foram misturadas com biomassa seca de bateria a 10 e 20% p/p com base no peso final da mistura. Então a mistura de casca de soja/microalgas biomassa foi condicionada em calor em um condicionador empilhado na vertical francês 424 antes de ser prensada em uma prensa de rosca de 8,9 cm (3,5") (French Oil Mill Company, Piqua, OH). O óleo e a torta prensada foram recuperados e pesados para estimar os rendimentos.

[00264] Um lote de controle de biomassa de *Prototheca moriformis* foi preparado de forma semelhante, mas sem a inclusão de cascas de soja. O lote de controle teve um teor de óleo de 52% (DCW) e um teor de umidade de 2,57%, após secagem em tambor. 70 libras do lote controle foram condicionadas em calor por 30 minutos em um condicionador empilhado na vertical, a 90,5 A 106,1°C (195 a 223°F) e o teor de umidade foi reduzido para 0,81 a 0,95%. 32,6 Kg (72 libras) de biomassa adicionada de 10% de cascas de soja com um teor de umidade inicial de 3,30% foram condicionadas em calor a 190,5 a 106,4°C (95 a 223,5°F) por 30 minutos e o teor de umidade foi reduzido para 1,06%. 70 libras da biomassa adicionada de 20% de cascas de soja com um teor de umidade inicial de 3,07% foram condicionadas em

calor a 208 a 227°C por 30 minutos e o teor de umidade foi reduzida para 1,47%. A biomassa condicionada em calor foi, então, alimentada na prensa de rosca. No lote de controle, 30 libras (fora das 70 libras que foram condicionadas em calor) foram alimentadas através da prensa antes da prensa ser obstruída. Aproximadamente (4,0 libras) de óleo foram recuperadas (incluindo sólidos) das 13,6 kg (30 libras) de biomassa que foram alimentadas através da prensa, tornando o rendimento de aproximadamente 20,5%. Na condição de 10% de casca de soja, 27,7 Kg (61 libras) (fora das 32,6 Kg (72 libras) que foram condicionadas em calor) foram alimentadas através da prensa e aproximadamente 3,2 Kg (7,0 libras) de óleo foi recuperado (incluindo sólidos), tornando o rendimento aproximadamente 20%. No teste de 20% de cascas de soja, todas as 31,7 Kg (70 libras) do material condicionado calor foram alimentadas através da prensa, mas quantidades mínimas (imensuráveis) de óleo foram recuperadas.

[00265] Com o sucesso dos experimentos de prensa em escala de laboratório descritos acima, a adição de auxílios de prensa ao caldo de fermentação após a colheita da biomassa de algas foi ampliada para uma prensa de rosca de óleo de escala piloto (prensa de rosca de semente oleaginosa de 8,9 cm (3,5") (French Oil Mill Company, Piqua, OH)). A biomassa de *Prototheca moriformis* foi preparada sob três diferentes condições experimentais: um controle negativo com nenhuma celulose (PB20) adicionada, biomassa com 25g/L de celulose adicionada ao caldo de fermentação após a colheita, e biomassa com 50g/L de celulose adicionada ao caldo de fermentação após a colheita. A biomassa de todas as três condições foi seca em um secador de tambor. A biomassa de controle negativo teve cerca de 58% de teor de óleo (DCW) e um teor de umidade de 6,68%. 63,5 Kg (140 libras) da biomassa de controle negativo foram, então, acondicionadas em um condicionador empilhado vertical a 107,2°C (225°F) por 45 minutos e o

teor de umidade após condicionamento em calor foi 2,5 a 3,5%. A biomassa adicionada de 25g/L de celulose teve um teor de umidade de 5,30% após secagem em tambor. 90,7 Kg (200 libras) de biomassa adicionada de 25g/L de celulose foram, então, condicionadas em um condicionador empilhado vertical a 93,3°C (200°F) por 45 minutos e o teor de umidade após condicionamento em calor foi 2,5 a 3,5%. A biomassa adicionada de 50g/L de celulose teve um teor de umidade de 4,35% após secagem tambor. 52,2 Kg (115 libras) da biomassa adicionada de 50g/L de celulose foram então acondicionadas em um condicionador empilhado vertical a 93,3°C (200°F) por 45 minutos e o teor de umidade após condicionamento em calor foi 2,5 a 3,5%. A biomassa a partir de cada condição experimental foi então alimentada através de prensa de semente óleo de 8,9 cm (3,5"). Na condição de controle negativo, 14,6 Kg (32,3 libras) de óleo (incluindo sólidos ou finos no óleo) foram recuperadas. A torta prensada a partir da condição de controle negativo foi analisada para o teor de óleo residual e a torta continha 42 a 52% (em peso) de óleo residual. Na condição de 25g/L de celulose, *

[00266] 39,7 Kg (87,6 libras) de óleo (incluindo sólidos no óleo) foram recuperadas. A torta prensada foi analisada para o teor de óleo residual e a torta continha 10 a 11% (em peso) de óleo residual. Nenhum óleo foi recuperado da condição adicionada de 50g/L de celulose. A biomassa não alimentou através da prensa e obstruiu a prensa depois de 5 minutos.

[00267] Os resultados deste experimento foram consistentes com os resultados da prensa de bancada em escala de laboratório. Embora uma quantidade modesta de óleo tenha sido recuperada da condição de controle negativo, ainda houve uma quantidade significativa de óleo residual deixado na torta prensada. A condição de 25g/L celulose teve o melhor desempenho, rendendo a maioria dos óleos com quantidade

mínima de óleo residual na torta prensada. A condição de 50g/L de celulose não rendeu qualquer óleo e obstruiu a prensa depois de 5 minutos de execução. Estes resultados mostraram que a adição de um auxílio de prensa ao caldo de fermentação da biomassa de microalgas colhida o co-seca pode aumentar o rendimento de óleo quando prensada em uma prensa de rosca de semente oleaginosa.

Prensagem Completa de duas Etapas em Escala Piloto de *Prototheca moriformis*

[00268] A prensagem completa de duas etapas de biomassa de *Prototheca moriformis* foi realizada por meio da qual a biomassa de *Prototheca moriformis* condicionada, seca, foi prensada em uma prensa expelidora e a biomassa gasta foi, então, condicionada por uma segunda vez e prensada em uma prensa expelidora por uma segunda vez.

[00269] A *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), contendo aproximadamente 62% de óleo (em peso de células secas) foi seca em tambor usando os métodos descritos acima no exemplo 3. Após a secagem em tambor, o teor de umidade da biomassa foi de cerca de 2,7%. A biomassa seca foi, então, condicionada em calor usando os métodos descritos no exemplo 3. O teor de umidade da biomassa após condicionamento em calor foi de cerca de 1,7 a 2,1%.

[00270] A prensagem de primeira passagem foi realizada na biomassa condicionada em calor usando uma prensa de rosca de semente oleaginosa de 8,9 cm (3,5") (French Oil Mill Company, Piqua, OH) com a gaiola preaquecida a 194 a 220°F. Aproximadamente 77,1% do óleo (em peso) foram recuperados a partir da biomassa de microalgas durante esta primeira passagem. A análise da torta prensada mostrou que havia cerca de 21% em peso de óleo residual.

[00271] A torta prensada foi condicionada em calor pela segunda vez para que a torta prensada atigisse cerca de 74,4 a 91,7°C (166 a 197°F).

O teor de umidade da torta prensada condicionada em calor foi de aproximadamente 1,8%. A torta condicionada em calor foi, então, alimentada na prensa com a gaiola preaquecida a 82,2 a 112,8°C (180 a 235°F). Aproximadamente 72,5% do óleo na torta foram recuperados nesta segunda passagem, com base no peso do óleo recuperado nesta segunda, a torta prensada da segunda prensa e o óleo disponível calculado na torta prensada após a primeira passagem através da prensa de rosca. Pela adição de óleo recuperado em ambas as passagens através da prensa, a recuperação total de óleo atingida com ambas as passagens foi de aproximadamente 92,9%.

Composição de Monossacarídeos da Biomassa de *Prototheca moriformis* Deslipidada

[00272] A biomassa de *Prototheca moriformis* com elevado teor de óleo foi, então, colhida e seca usando um secador de tambor. A biomassa de algas seca foi lisada e o óleo foi extraído usando uma prensa expelidora como descrito neste documento. O óleo residual na biomassa prensada foi então extraído por solvente usando éter de petróleo. Éter de petróleo residual foi evaporado da refeição deslipidada usando um Rotovapor (Buchi Labortechnik AG, Suíça). A análise da composição de Glicosil (monossacarídeo) foi então realizada na refeição deslipidada usando cromatografia gasosa/espectrometria de massa combinadas (GC/MS) dos derivados de per-O-trimetilsilil (TMS) de glicosídeos metil monossacarídeos produzidos a partir da amostra por metanólise ácida. Uma amostra de refeição deslipidada foi submetida a metanólise em HCl 1M em metanol a 80°C por aproximadamente 20 horas, seguido de re-N-acetilação com piridina e anidrido acético em metanol (para detecção de açúcares amino). As amostras foram, então, per-O-trimetilsililadas pelo tratamento com Tri-Sil (Pierce) a 80°C por 30 minutos (vide methods in Merkle and Poppe (1994) *Methods Enzymol.* 230: 1-15 and York et al., (1985) *Methods*

Enzymol. 118:3-40). A análise de GC/MS dos TMS metil glicosídeos foi realizada em um HP 6890 GC interfaceado com um MSD 5975b, usando uma coluna capilar de sílica fundida com AllTech EC-1 (30m x 0,25 mm ID). Os monossacarídeos foram identificados por seus tempos de retenção em comparação com os padrões, e as características desses carboidratos são autenticadas por seus espectros de massa. 20 microgramas por amostra de inositol foram adicionados à amostra antes da derivatização como padrão interno. O perfil do monossacarídeo de biomassa de *Prototheca moriformis* deslipidada (UTEX 1435) está resumido na tabela 15 abaixo.

Tabela 15. Análise da Composição de Monossacarídeos (glicosil) de Biomassa de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) deslipidada.

	Massa (µg)	% Molar (de carboidrato total)
Arabinose	0,6	1,2
Xilose	n.d.	n.d.
Ácido Galacturônico (GalUA)	n.d.	n.d.
Manose	6,9	11,9
Galactose	14,5	25,2
Glicose	35,5	61,7
N Acetil galactosamina (GalNAc)	n.d.	n.d.
N Acetil Glucosamina (GlcNAc)	n.d.	n.d.
Heptose	n.d.	n.d.
Ácido 3 Deoxi-2-mano-2 Octulsônico (KDO)	n.d.	n.d.
Soma	57	100

n.d. = nenhum detectado

[00273] Duas amostras de biomassa de *Prototheca moriformis* deslipidadas (UTEX 1435) também foram analisadas para teor de fibra alimentar usando o método AOAC 991.43. O teor de fibra alimentar para as duas amostras foi 22,89% e 33,06%.

EXEMPLO 10**Extração por Solvente de Torta Prensada de Biomassa de Microalgas**

[00274] Para maximizar o rendimento total de óleo a partir da biomassa de microalgas, a torta prensada (como descrito nos exemplos anteriores) foi submetida à extração por solvente usando um extrator tipo tambor de lote e hexano comercial como solvente. A biomassa prensada foi misturada com o hexano comercial no extrator. A extração do óleo foi realizada no extrator de tambor pela lavagem da torta prensada três vezes com hexano comercial usando um solvente para razão de sólidos entre 0,7:1 a 2:1. A temperatura do extrator foi mantida no entre 50 a 55°C (122°F a 131°F), para um tempo de residência de 1 hora para cada lavagem e um vácuo leve de 2,54 a 5,08 cm (1 a 2 polegadas) de água. O extrator de tambor foi girado continuamente durante cada lavagem para melhorar a eficiência da extração da mistura.

[00275] A miscela de óleo-hexano deixando o extrator foi filtrada através de um filtro de um micron e, em seguida, evaporada a um teor mínimo de solvente em um vaso de evaporação de lote. O solvente foi removido por evaporação a 76,7 a 93,3°C (170°F a 200°F) e um vácuo de 50,8 a 60,9 cm (20 a 24 polegadas) de Hg. 0,5% a 2% de nitrogênio foram pulverizados para alcançar baixos residuais de solvente no óleo bruto. O óleo bruto dissolubilizado foi, então, empacotado em recipientes de 19 l (5 galões). A refeição gasta úmida ("bagaço") foi dissolubilizada no mesmo vaso extrator de tambor após a miscela de óleo-hexano ter sido bombeada para fora. A Dissolubilização e secagem do bagaço foram realizadas no extrator de tambor pelo aquecimento da biomassa a 104,4 a 115,5°C (220°F a 240°F) usando apenas vapor indireto. A refeição dissolubilizada foi empacotada em tambores de fibra de 167 l (44 galões).

[00276] Os vapores de solventes a partir do extrator de tambor e do

evaporador de óleo foram condensados e recuperados no tanque de água solvente onde a água e os sólidos foram removidos. O solvente recuperado foi armazenado e pode ser reutilizado em extrações por solvente futuras.

EXEMPLO 11

Secagem e Extração de Óleo de Leveduras Oleaginosas

[00277] A cepa de levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis* (DSMZ-DSM 70398) foi cultivada de acordo com os métodos do Exemplo 1 para produção de biomassa de levedura oleaginosa, com aproximadamente 50% de lipídios por DCW. O caldo de levedura colhido foi seco por meio de três diferentes métodos para comparação: (1) bandeja seca em forno de ar forçado a 75°C durante a noite, (2) seca em um secador de tambor sem concentração, e (3) o caldo de levedura foi concentrado para 22% de sólidos e a lama foi então seca em um secador de tambor. O material de cada uma das três diferentes condições de secagem foi condicionado em calor e alimentado através de uma prensa de rosca para extração de óleo. A temperatura de prensa foi de 65,5°C (150 °F) e a biomassa de levedura seca condicionada foi mantida a cerca de 87,7°C (190°F) até que a mesma estivesse pronta para ser colocada na prensa.

[00278] O teor de umidade do caldo de levedura seca em tambor sem concentração foi de 5,4% e as leveduras secas em tambor foram, então, acondicionadas em estufa a 90°C por 20 minutos. O teor de umidade após condicionamento foi de 1,4%. A levedura seca em tambor condicionada foi então alimentada em prensa de rosca Taby de bancada para extração de óleo. Este material era bem oleoso, com mínimo depósito.

[00279] O teor de umidade do caldo de levedura concentrado seco em tambor foi de 2,1% e a levedura concentrada seca em tambor foi, então, acondicionada em estufa a 90°C por 20 minutos. O teor de umidade após o condicionamento foi de 1,0%. A levedura concentrada

seca em tambor condicionada foi, então, alimentada em uma prensa de rosca Taby de bancada para extração de óleo. Este material era bem oleoso, com mínimo depósito.

EXEMPLO 12

Secagem e Extração de Óleo de Bactérias Oleaginosas

[00280] A cepa de bactéria oleaginosa *Rhodococcus opacus* PD630 (DSMZ-DSM 44193) foi cultivada de acordo com os métodos do exemplo 1 para produção de biomassa de bactérias oleaginosas, com aproximadamente 32% de lipídios por DCW.

[00281] O caldo de *Rhodococcus opacus* colhido foi concentrado usando centrifugação e, em seguida, lavado com água deionizada e ressuspensão em 1.8L de água deionizada. 50 gramas de celulose purificada (Pb20-Pre-co-Floc, EP Minerals, Nevada) foram adicionados à biomassa ressuspensa e os sólidos totais foram ajustados com água deionizada para 20%. A biomassa de *Rhodococcus* foi então seca em um secador de tambor e do teor de umidade de *Rhodococcus* após a secagem em um secador de tambor foi de aproximadamente 3%.

[00282] O material seco em tambor foi então condicionado em calor em uma estufa a 130°C por 30 minutos com um teor de umidade resultante de cerca de 1,2%. A biomassa condicionada em calor foi então alimentada através de uma prensa Taby de bancada (prensa de rosca) para extração de óleo. A temperatura da prensa estava em 98,3°C (209°F) e a biomassa de levedura seca condicionada foi mantida em cerca de 115,5°C (240°F) até que a mesma estivesse pronta para ser colocada na prensa. Recuperação de óleo foi acompanhada pelo depósito pesado.

EXEMPLO 13

Genotipagem de Cepas de Microalgas

[00283] As amostras de microalgas de 23 cepas listadas na tabela 5 acima foram genotipadas. O DNA genômico foi isolado a partir da

biomassa de algas como se segue. As células (aproximadamente 200 mg) foram centrifugadas a partir das culturas líquidas 5 minutos a 14.000 x g. As células foram então ressuspensas em água destilada estéril, centrifugadas 5 minutos a 14.000 xg e o sobrenadante descartado. Uma esfera de vidro única ~ 2mm de diâmetro foi adicionada à biomassa e os tubos foram colocados a -80°C durante pelo menos 15 minutos. As amostras foram removidas e 150 µL de tampão de moagem (Sarcosil a 1%, sacarose 0,25 M, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, 0,5 ug/ul de RNase A) foi adicionado. Os péletes foram ressuspensos por vortex brevemente, seguido pela adição de 40 ul de NaCl 5M. As amostras foram vortexadas brevemente, seguido pela adição de 66 µl de CTAB a 5% (brometo de cetil trimetilamônio) e um vórtice final breve. As amostras foram incubadas próximas a 65°C por 10 minutos, após o que elas foram centrifugadas a 14.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e extraído uma vez com 300 µl de Fenol: Clorofórmio: álcool isoamílico 12:12:1, seguido por centrifugação por 5 minutos a 14.000 x g. A fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo contendo 0,7 vol de isopropanol (~190 µL), misturado por inversão e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos ou durante a noite a 4°C. O DNA foi recuperado através de centrifugação a 14.000 xg por 10 minutos. O pélete resultante foi lavado duas vezes com etanol 70%, seguido por uma lavagem final com 100% de etanol. Os péletes foram secos ao ar por 20 a 30 minutos em temperatura ambiente seguido por ressuspensão a 50 µl de TrisCl 10mM, EDTA 1mM (pH 8,0).

[00284] Cinco µl de DNA de algas total, preparados como descrito acima foram diluídos 1:50 em Tris 10 mM, pH 8,0. As reações de PCR, volume final de 20 µl, foram configuradas como segue. Dez µl de mix mestre iProof HF 2 x (BIO-RAD) foi adicionado a 0,4 µl de iniciador (5'-TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC-3' (SEQ ID NO:24) na concentração

estoque de 10mM). Esta sequência de iniciador executa a partir da posição 567-588 no número de acesso do banco de genes L43357 e é altamente conservada em plantas superiores e genomas de plastídeos de algas. Isto foi seguido pela adição de 0,4 µl de iniciador (5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (SEQ ID NO:25) em concentração estoque de 10 mM). Esta sequência de iniciadores é complementar à posição em 1112-1093 no número de acesso L43357 do banco de genes e é altamente conservada em plantas superiores e genomas de plastídeos de algas. Em seguida, 5 µl de DNA total diluído e 3,2 µl dH₂O foram adicionados. As reações de PCR foram executadas como segue: 98°C, 114,3 cm (45"); 98°C, 20,3 cm (8"); 53°C, 3 0,5 cm (12"), 72°C, 50,8 cm (20") por 35 ciclos, seguido de 72°C durante 1 min e mantendo a 25°C. Para a purificação de produtos de PCR, 20 µl de Tris 10 mM, pH 8,0, foram adicionados a cada reação, seguido por extração com 40 µl de Fenol: Clorofórmio: álcool isoamílico 12:12:1, vórtex e centrifugação a 14.000 xg por 5 minutos. As reações de PCR foram aplicadas a colunas S-400 (GE Healthcare) e centrifugadas por 2 minutos a 3.000 x g. Os produtos de PCR purificados foram posteriormente clonados em TOPO em PCR8/GW/TOPO e os clones positivos foram selecionados para placas LB/Spec. O DNA plasmidial purificado foi sequenciado em ambas as direções usando iniciadores M13 diretos e reversos. As sequências das 23 cepas de microalgas estão listadas como SEQ ID NOs:1-23 na Listagem de Sequências anexa (vide Tabela 5 para a correlação). Além disso, várias cepas de *Prototheca* de microalgas (vide tabela 16, abaixo) também foram genotipadas usando os métodos e iniciadores descritos acima. As sequências genômicas 23S rRNA estão listadas como SEQ ID NOs:26-34 na Listagem de Sequências anexa e são descritas a seguir.

Tabela 16. Cepas *Prototheca* de microalgas.

<u>Espécies</u>	<u>Cepa</u>	<u>SEQ ID NO.</u>
<i>Prototheca kruegani</i>	UTEX 329	SEQ ID NO:26
<i>Prototheca wickerhamii</i>	UTEX 1440	SEQ ID NO:27
<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 1442	SEQ ID NO:28
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 288	SEQ ID NO:29
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1439; 1441; 1435; 1437	SEQ ID NO:30
<i>Prototheca wickerhamii</i>	UTEX 1533	SEQ ID NO:31
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1434	SEQ ID NO:32
<i>Prototheca zopfii</i>	UTEX 1438	SEQ ID NO:33
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1436	SEQ ID NO:34

Genotipagem de Cepas de Leveduras Oleaginosas

[00285] A Genotipagem de 48 cepas diferentes de levedura oleaginosa foi realizada. O DNA genômico foi isolado de cada um das 48 diferentes cepas da biomassa de levedura de oleaginosa como se segue. Células (aproximadamente 200 mg) foram centrifugadas a partir de culturas líquidas 5 minutos a 14.000 x g. As células foram então ressuspensas em água destilada estéril, centrifugadas 5 minutos a 14.000 xg e o sobrenadante descartado. Uma esfera de vidro única ~ 2mm de diâmetro foi adicionada à biomassa e os tubos foram colocados a -80°C durante pelo menos 15 minutos. As amostras foram removidas e 150 µl de tampão de moagem (Sarcosil a 1%, sacarose 0,25 M, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, 0,5 ug/ul de RNase A) foi adicionado. Os péletes foram ressuspensos por vortex brevemente, seguido pela adição de 40ul de NaCl 5M. As amostras foram centrifugadas brevemente, seguido pela adição de 66 µl de CTAB a 5% (brometo de cetil trimetilamônio) e um vórtice breve final. As amostras foram incubadas próximas a 65°C por 10 minutos, após o que foram centrifugadas a 14.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e extraído uma vez com 300 µl de Fenol:

Clorofórmio: álcool isoamílico 12:12:1, seguido de centrifugação por 5 minutos a 14.000 x g. A fase aquosa resultante foi transferida para um novo tubo contendo 0,7 vol de isopropanol (~190 µl), misturado por inversão e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos ou durante a noite a 4°C. O DNA foi recuperado através de centrifugação a 14.000 xg por 10 minutos. O pélete resultante foi lavado duas vezes com etanol a 70%, seguido por uma lavagem final com etanol a 100%. Os péletes foram secos ao ar por 20-30 minutos em temperatura ambiente seguido por ressuspensão em 50 µl de TrisCl 10mM, EDTA 1mM (pH 8,0).

[00286] Cinco µl de DNA de algas total, preparados como descrito acima, foram diluídos 1:50 em Tris 10 mM, pH 8,0. As reações de PCR, o volume final de 20 µl, foram configuradas como se segue. Dez µl de mix mestre iProof HF 2 x (BIO-RAD) foram adicionados a 0,4 µl de iniciador direto SZ5434 (5' GTCCCTGCCCTTTGTACACAC -3' (SEQ ID NO: 35) na concentração estoque de 10mM) e 0,4 µl de iniciador reverso SZ5435 (5'- TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGG -3' (SEQ ID NO: 36) em concentração estoque 10 mM). Os iniciadores foram selecionados com base na conservação de sequência entre três regiões principais de 18S e cinco regiões principais de genes 26S rRNA de fungos. Por referência, o iniciador direto é idêntico aos nucleotídeos 1632-1652 Genbank Acession # AY550243 e o iniciador reverso é idêntico aos nucleotídeos 464271-464293 do Genbank Acession # NC_001144. Em seguida, 5 µl de DNA total diluído e 3,2 µl de dH₂O foram adicionados. As reações de PCR foram executadas como segue: 98°C, 45 segundos; 98°C, 8 segundos, 58°C, 12 segundos; 72°C, 36 segundos para 35 ciclos seguidos de 72°C por 1 min e mantendo a 4°C. Para a purificação de produtos de PCR, 20 µl de Tris 10 mM, pH 8,0, foi adicionado a cada reação, seguido de extração com 40 µl de Fenol: Clorofórmio: álcool isoamílico 12:12:1, vórtex e centrifugação a 14.000

xcg por 5 minutos. As reações de PCR foram aplicadas a colunas S-400 (GE Healthcare) e centrifugadas por 2 minutos a 3.000 xg. Os produtos de PCR purificados resultantes foram clonados e transformados em *E. coli* usando kit de vetor ZeroBlunt PCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas diretamente sobre colônias resistentes à ampicilina. O DNA plasmidial purificado foi sequenciado em ambas as direções usando iniciadores diretos e reversos M13.

[00287] Uma lista das 48 cepas de leveduras oleaginosas que foram genotipadas é resumida a seguir na tabela 17, juntamente com as SEQ ID NOs correspondentes.

Tabela 17. Cepas de Leveduras Oleaginosas.

<u>Nome da Cepa</u>	<u>Número da cepa</u>	<u>SEQ ID NO</u>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DSMZ-DSM 70398	SEQ ID NO:37
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 5911	SEQ ID NO:70
<i>Rhodotorula glutinis</i> var.		
<i>glutinis</i>	CBS 3044	SEQ ID NO:38
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 8664	SEQ ID NO:71
NO: 71		
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 1808	SEQ ID NO:39
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 1810	SEQ ID NO:39
<i>Lipomyces starkeyi</i>	CBS 1809	SEQ ID NO:40
<i>Trichosporon montevidense</i>	CBS 8261	SEQ ID NO:72
NO: 72		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 6331	SEQ ID NO:41
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5324	SEQ ID NO:42
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> var.	CBS 316	SEQ ID NO:73
<i>mucilaginosa</i>		
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 570	SEQ ID NO:42
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2176	SEQ ID NO:42
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2744	SEQ ID NO:42
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2754	SEQ ID NO:42

<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2829	SEQ ID NO:42
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5163	SEQ ID NO:42
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5358	SEQ ID NO:42
<i>Trichosporon sp.</i>	CBS 7617	SEQ ID NO:43
<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	CBS 482	SEQ ID NO:44
<i>Rhodotorula glutinis var. glutinis</i>	CBS 324	SEQ ID NO:45
<i>Rhodotorula glutinis var. glutinis</i>	CBS 4476	SEQ ID NO:46
<i>Trichosporon behrend</i>	CBS 5581	SEQ ID NO:47
<i>Geotrichum histeridarum</i>	CBS 9892	SEQ ID NO:48
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	CBS 8411	SEQ ID NO:49
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 8126	SEQ ID NO:74
<i>Trichosporon domesticum</i>	CBS 8111	SEQ ID NO:50
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CBS 8761	SEQ ID NO:51
<i>Rhodotorula terpendoidalis</i>	CBS 8445	SEQ ID NO:52
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 10144	SEQ ID NO:53
<i>Rhodotorula glutinis var. glutinis</i>	CBS 5805	SEQ ID NO:54
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 10143	SEQ ID NO:55
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 5607	SEQ ID NO:56
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 5589	SEQ ID NO:57
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 8724	SEQ ID NO:58
<i>Rhodosporidium</i>		
<i>sphaerocarpum</i>	CBS 2371	SEQ ID NO:59
<i>Trichosporon brassicae</i>	CBS 6382	SEQ ID NO:60
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2755	SEQ ID NO:61
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 7656	SEQ ID NO:75
<i>Lipomyces starkeyi</i>	CBS 7786	SEQ ID NO:62
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 6012	SEQ ID NO:63
<i>Trichosporon loubieri var.</i>		
<i>loubieri</i>	CBS 8265	SEQ ID NO:64
<i>Geotrichum vulgare</i>	CBS 10073	SEQ ID NO:65
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	CBS 14	SEQ ID NO:66
<i>Rhodotorula glutinis var.</i>		
<i>glutinis</i>	CBS 6020	SEQ ID NO:67

<i>Lipomyces orientalis</i>	CBS 10300	SEQ ID NO:76
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	CBS 317	SEQ ID NO:68
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CBS 2924	SEQ ID NO:69

[00288] Todas as referências citadas neste documento, incluindo patentes, pedidos de patentes e publicações de revistas científicas, são incorporadas por referência em suas totalidades, se previamente especificamente incorporadas ou não. Em particular, o Pedido PCT No. _____ (Protocolo do procurador No. 026172-004150PC), depositado em 14 de abril de 2010, intitulado "Novel Microalgal Food Compositions" é incorporado neste documento por referência. As publicações mencionadas neste documento são citadas com o objetivo de descrever e divulgar reagentes, metodologias e conceitos que podem ser usados em conexão com a presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a extração de óleos triglicerídeos a partir de biomassa de microalga, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) secar a biomassa de microalga para produzir biomassa de microalga seca;

(b) condicionar a biomassa de microalga seca para produzir matéria-prima condicionada tendo um teor de umidade de 0,1% a 6%, em peso, por aquecimento da biomassa de microalga seca a uma temperatura na faixa de 65,5°C a 148,9°C; e

(c) submeter a matéria-prima condicionada a pressão de pelo menos 10.000 psi para separar pelo menos 25% do óleo na biomassa dos outros componentes,

deixando biomassa gasta do teor de óleo reduzido em relação à matéria-prima condicionada, a dita biomassa gasta compreendendo entre menos de 50% de óleo e menos de 1% de óleo, em peso.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um agente de avultamento é adicionado à biomassa de microalga seca antes de condicioná-la.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a matéria-prima condicionada tem um teor de umidade de 0,1% a 2,5%, em peso.

4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a matéria-prima condicionada tem um teor de umidade de 1% a 2%, em peso.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que os óleos triglicerídeos são extraídos por uma prensa expelidora.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a biomassa de microalga é submetida a um ou mais

ciclos de pressão oscilante, em que cada ciclo consiste em uma pressão inferior para um primeiro período de tempo seguido de uma pressão maior para um segundo período de tempo, em que, se mais do que um ciclo é conduzido, então a média de pressão exercida na biomassa durante o curso do último ciclo é pelo menos duas vezes maior do que a pressão média exercida na biomassa durante o curso do primeiro ou qualquer ciclo prévio.

7. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a prensa expelidora é um movimento de rotação contínua do eixo sem-fim no interior de uma gaiola que tem um alimentador em uma extremidade e um estrangulamento na extremidade oposta do mesmo, e tem aberturas dentro da gaiola,

em que a gaiola tem um comprimento interno que se encontra entre, pelo menos, dez vezes para pelo menos 20 vezes do seu diâmetro interno e compreende uma pluralidade de barras alongadas, com pelo menos algumas das barras alongadas separadas por um ou mais espaçadores, as barras estão sobre uma estrutura, em que o um ou mais espaçadores entre as barras formam as aberturas, e óleos são liberados através das aberturas para um recipiente de coleta ligado hidraulicamente com a gaiola,

em que os espaçadores entre as barras alongadas são de diferentes espessuras permitindo assim que a variação do espaço entre cada barra alongada, em que tanto os espaçadores ou os espaços entre as barras são 0,012 a 0,076 cm (0,005 a 0,030 polegadas) de espessura,

em que a biomassa adentra a gaiola através do alimentador, e a rotação do eixo sem-fim agiliza a biomassa ao longo da gaiola e aplica pressão à biomassa, disposta entre a gaiola e o estrangulamento, pressionando as células lisadas da biomassa e liberando óleo através das aberturas da gaiola, e a biomassa gasta do teor de óleo reduzido é

extrudida a partir da extremidade de estrangulamento da gaiola.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a pressão aumenta em um fator de 10 a 20 a partir da extremidade de alimentação para a extremidade de estrangulamento da gaiola e não aumenta em mais de 100% da pressão na extremidade de alimentação da gaiola por metro linear da gaiola entre as extremidades de alimentação e estrangulamento da gaiola.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que compreende ainda extrair os óleos triglicerídeos da biomassa gasta do teor de óleo reduzido com um solvente orgânico.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico é hexano.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda condicionar a biomassa de microalga para alterar as suas propriedades físicas ou físico-químicas sem liberar mais de 5% dos óleos triglicerídeos e para fornecer uma biomassa de microalga com um teor de umidade de entre 0,1% e 2,5%, em peso, em que o referido condicionamento é selecionado de um ou mais dos seguintes:

aquecimento da biomassa a 65,5 a 148,9°C (150 a 300 °F);

submissão da biomassa a uma primeira pressão que não libera mais do que 5% dos lipídeos na biomassa;

tratamento da biomassa com um expensor ou extrusor; ou

adição de um agente de avultamento à biomassa microbiana para facilitar a liberação dos lipídeos quando a biomassa microbiana é submetida a pressão.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a biomassa é condicionada com calor a 65,5 a 148,9°C (150 a 300°F) por um período de tempo entre 10 e 60 minutos.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o agente de avultamento é selecionado dentre o grupo consistindo em painço amarelo, casca de soja, alecrim seco, forragem de milho, celulose, bagaço de cana-de-açúcar ou biomassa de microalga gasta que compreende entre 40% e 90% de polissacarídeo e menos de 10% de óleo, e é adicionado à biomassa de microalga antes de uma etapa de desidratar a biomassa microalga até um teor de umidade inferior a 6%.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a biomassa de microalgas é derivada de uma cultura que foi cultivada através de um processo heterotrófico, ou um processo fotoautotrófico.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a biomassa de microalgas compreende um perfil de ácido graxo de:

menos de 2% de C14:0; 13 a 16% de C16:0; 1 a 4% de C18:0; 64 a 71% de C18:1; 10 a 15% de C18:2; 0,5 a 2% de C18:3; e menos de 1% de comprimento de cadeia de carbono de 20 ou mais longo;

1 a 2% de C14:0; 16 a 26% de C16:0; 2 a 6% de C18:0; 58 a 68% de C18:1; e 7 a 11% de C18:2;

pelo menos 4% de C8-C14, em que a microalga contém um gene exógeno codificando uma tioesterase com uma preferência por um ou mais comprimentos de cadeia de ácido graxo de 8, 10, 12 e 14 átomos de carbono;

entre 10 e 40% de C8 a C14; ou

pelo menos 15% de ácidos graxos C:16, pelo menos 50% de ácidos graxos C18:1, pelo menos 7% de ácidos graxos C18:2 e menos de 3% de ácidos graxos C10:0 a C14:0.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 15, caracterizado pelo fato de que os óleos triglicerídeos extraídos compreendem uma ou mais propriedades selecionadas dentre:

menos de 0,01 miligrama de clorofila por quilograma de óleos triglicerídeos; ou

ou uma ou mais das seguintes: menos de 8 ppm de cloreto, não mais de 2 ppm de fósforo, não mais de 26 ppm de potássio, não mais de 12 ppm de sódio e não mais de 5 ppm de enxofre.

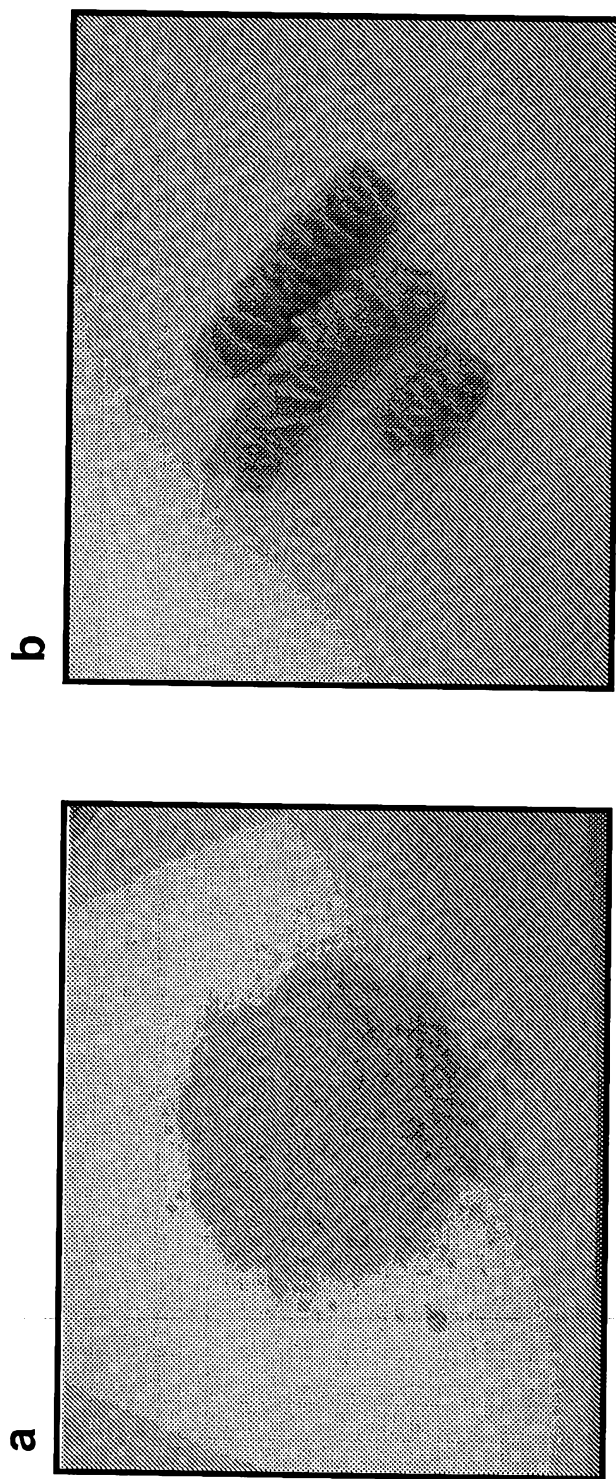


FIG. 1

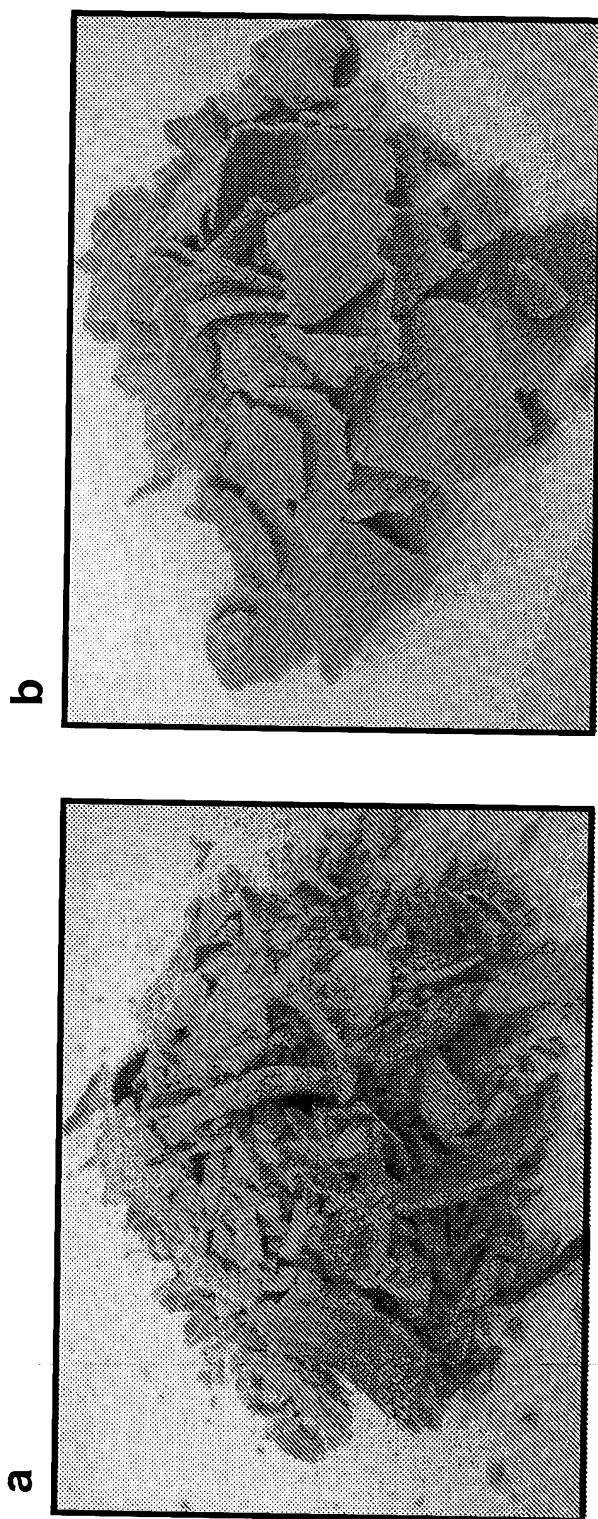


FIG. 2