

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 879**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2008 PCT/US2008/010454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2009 WO09035551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2008 E 08830498 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2198038**

54 Título: **Método para producir aceite biológico usando un fermentador no estéril**

30 Prioridad:

12.09.2007 US 960037 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.04.2018

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

LIPPMEIER, JAMES, CASEY;

PFEIFER III, JOSEPH, W.;

HANSEN, JON, MILTON;

APT, KIRK, E.;

BARCLAY, WILLIAM, ROBERT;

BEHRENS, PAUL, WARREN y

MARTIN, DAVID, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 665 879 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir aceite biológico usando un fermentador no estéril

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la producción de aceite biológico cultivando un microorganismo del género *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* o *Ulkenia*, donde la fermentación se realiza en un fermentador no estéril. El proceso de la presente invención comprende la fermentación de un microorganismo, preferiblemente usando una materia básica que contiene celulosa. La presente invención también se refiere a métodos de producción de biocombustibles basados en lípidos y aditivos de combustible, y productos alimenticios, nutricionales y farmacéuticos usando estos aceites biológicos.

15 Antecedentes de la invención

La producción de aceites biológicos a partir de fuentes tales como plantas (incluyendo semillas oleaginosas), microorganismos y animales es esencial para diversos fines. Por ejemplo, la producción de biocombustible requiere grandes cantidades de aceites biológicos. El biodiésel se ha propuesto como un combustible líquido de carbono-neutro alternativo al gasóleo derivado del petróleo. El biodiésel se forma muy habitualmente por la transesterificación de grupos acilo de lípidos de aceites vegetales usando un alcohol simple (tal como metanol, etanol o isopropanol). Los ésteres de alquilo resultantes entonces pueden quemarse directamente en motores de ignición por compresión más modernos sin ninguna modificación mecánica. La densidad de energía del biodiésel se ha estimado en un 95 % de la del petrodiésel (o "gasóleo fósil"). Sin embargo, la mayor capacidad de lubricación del biodiésel (y, por tanto, la eficacia mejorada del combustible) provoca un kilometraje aproximadamente igual obtenido de volúmenes equivalentes de gasóleo fósil o biodiésel.

Como el biodiésel actualmente se fabrica principalmente a partir de aceites de semilla de plantas que fijan CO₂, el combustible se considera "de carbono-neutro" porque todo el CO₂ emitido de la quema del biodiésel ya estaba en la atmósfera recientemente en oposición al gasóleo fósil que cuando se quema libera carbono que no ha estado en la atmósfera durante millones de años. Por lo tanto, el biodiésel y otros combustibles de carbono-neutro pueden tener mucho para contribuir o los esfuerzos mundiales para reducir la emisión de gases invernadero (tales como CO₂).

Varios estados de los Estados Unidos han ordenado que el biodiésel se mezcle con el gasóleo fósil vendido en ese estado y el gobierno federal también ha establecido objetivos para el uso de combustible de transporte renovable. Los proveedores actuales de aceites vegetales para la conversión a biodiésel han tenido problemas para cumplir estos niveles ordenados, provocando mayores precios para muchos cultivos de semillas oleaginosas, particularmente soja. Si continúa la tendencia actual, los precios de cultivos de semillas oleaginosas importantes podrían subir significativamente. Finalmente, el objetivo es suplantar todas las fuentes de combustibles fósiles con alternativas de base biológica de precio competitivo. Desafortunadamente, si las fuentes actuales de aceite para biodiésel no cambian significativamente, puede que no se logre nunca este objetivo.

Al reconocer este reto, se han realizado investigaciones sobre fuentes alternativas de aceite para la producción de biodiésel, incluyendo la viabilidad de fabricar biodiésel a partir de algas fotosintéticas cultivadas en lagos abiertos. Como algunas algas son oleaginosas y crecen muy rápidamente (para algunas, el tiempo transcurrido desde el inóculo hasta la recolección es de menos de dos semanas), el rendimiento teórico de aceite por acre por año podría ser órdenes de magnitud mayor que lo que podría obtenerse de plantas superiores. Debe apreciarse que las pequeñas partes de las semillas de la mayoría de las plantas superiores que producen aceite representan únicamente una pequeña fracción de la masa global de la planta, mientras que las microalgas fotosintéticas podrían acumular un porcentaje mayor de su masa como aceite útil para la producción de biodiésel. Sin embargo, hay graves problemas con la tecnología de algas fotosintéticas que evitan el aumento de escala masivo que se requiere para competir de forma eficaz con la tecnología del gasóleo fósil.

Las microalgas fotosintéticas a menudo tenían que complementarse con CO₂ para conseguir altos rendimientos de aceite. Desde la perspectiva de la biorremediación, esto es realmente un beneficio ya que el exceso de CO₂ liberado del carbono o las plantas eléctricas alimentadas con petróleo, que de lo contrario se liberaría a la atmósfera, podría usarse como materia básica para fabricar biodiésel. Esta estrategia obviamente no produce un combustible realmente de carbono-neutro ya que el CO₂ de una planta de carbón aun se libera a la atmósfera finalmente (después de quemar el biodiésel), pero retarda la tasa a la que se libera el CO₂ derivado de fósil y genera energía más útil por unidad de masa de combustible fósil. De hecho, varias empresas se han establecido para invertir en esta tecnología, incluyendo Greenfuels Inc. Greenfuels usa específicamente sistemas de fotobiorreactor cerrados que disuelven niveles muy altos de CO₂ de plantas eléctricas que queman combustible fósil en cultivos de algas fotosintéticas. Debido a las limitaciones biofísicas de la autoprotección contra la luz, la acumulación de biomasa depende del área superficial iluminada total. Por tanto, se requieren muchos fotobiorreactores para producir cantidades incluso limitadas de biodiésel. Por lo tanto, aunque esta tecnología es útil como una estrategia de biorremediación para secuestrar carbono (y otros gases invernadero) de plantas eléctricas que queman combustible

fósil, es poco probable que pueda aumentarse a escala hasta los niveles requeridos para cumplir las futuras demandas de biodiésel.

5 Para abordar las cuestiones de cambio de escala, otras organizaciones han optado por desarrollar adicionalmente tecnologías de lago abierto para fabricar biodiésel derivado de algas fototróficas. Los sistemas de lago abierto también dependen de la complementación con CO₂ para niveles hipotéticamente económicos de acumulación de aceite. Por lo tanto, estos sistemas también pueden considerarse mejor como sistemas de biorremediación de carbono residual de combustible fósiles. Los rendimientos por acre por año de aceite útil de estos sistemas son órdenes de magnitud mayores que lo que puede obtenerse de cultivos oleaginosos. Desde la mayoría de las perspectivas, estos sistemas parecen ser la mejor respuesta a los suministros limitados de aceite de biodiésel. Sin embargo, hay un problema significativo que todavía no se ha abordado. Aunque los rendimientos teóricos absolutos de aceite por acre por año son bastante altos, la densidad real de biomasa acumulada en sistemas de lago abierto está relativamente diluida. A causa de esto, tienen que procesarse volúmenes masivos de medio de cultivo para extraer el aceite de la biomasa, lo que podría aumentar significativamente los costes del aceite final.

15 Una ruta para el remplazo de la gasolina con alternativas renovables tal como etanol es menos compleja. Debe apreciarse, sin embargo, que los mercados para los motores de combustión por compresión (que queman gasóleo fósil o biodiésel) y para los motores de combustión por ignición (que queman gasolina o etanol) generalmente atienden diferentes necesidades. Los motores de ignición por compresión ofrecen un par de torsión superior, que les hace más útiles en aplicaciones industriales sobre los motores de combustión por ignición, que ofrecen mayor aceleración (haciendo, por tanto, que los últimos sean más populares para el desplazamiento general). Por tanto, no hay razones para esperar que el motor de combustión por ignición pudiera remplazar completamente el motor de combustión por compresión si alguna vez se adoptara completamente un remplazo renovable de la gasolina.

20 A pesar de ciertas desventajas, mucho se ha logrado sobre el potencial del etanol para suplantarse la gasolina como combustible de transporte líquido. El modelo brasileño, que depende de la caña de azúcar como materia básica para la fermentación de etanol, a menudo se ha citado como ejemplo pionero para la viabilidad de biocombustible. Desafortunadamente, los Estados Unidos no tienen un clima que pudiera soportar el tipo de productividad de caña de azúcar necesario para una producción masiva de etanol. Los esfuerzos iniciales en el aumento de escala de la fermentación de etanol americano han usado jarabe de maíz y maicena como materia básica, pero hay cierta controversia rodeando la sostenibilidad y capacidad de cambio de escala de esta disposición también. A causa de esto, los esfuerzos más recientes se han centrado en fuentes "celulósicas" de azúcares para su uso como materias básicas en la fermentación de etanol. La materia básica celulósica puede ser cualquier materia básica que contenga celulosa.

35 Como la mayoría de las plantas están compuestas principalmente de polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y lignano, la superficie puede usarse de forma más eficaz si se movilizan los monómeros de azúcar de celulosa y otros polisacáridos estructurales como materia básica para la fermentación de etanol. Esto está en contraste con el uso de maicena, que se encuentra únicamente en los granos de la planta de maíz y constituyen un porcentaje relativamente bajo del peso seco del cultivo. Adicionalmente, como todas las plantas contienen celulosa, pueden usarse plantas de crecimiento mucho más rápido y más tolerantes al clima como fuente primaria de azúcar basado en celulosa. Los ejemplos de dichas plantas incluyen pasto varilla, *Miscanthus giganteus*, y álamo.

40 Los cultivos de biodiésel primarios actuales usan la tierra de una manera similarmente ineficaz (como el maíz para el etanol) ya que únicamente el aceite de las semillas de los cultivos de biodiésel se usa para fabricar biodiésel. Los procesos de etanol celulósico aun tienen que adoptarse en una amplia escala, pero hasta ahora el etanol celulósico se ha aceptado ampliamente como posible alternativa sostenible y económicamente competitiva a la gasolina. Las materias básicas celulósicas ya se están considerando para la fabricación de otros productos derivados del petróleo (como plásticos).

50 Las publicaciones de solicitud de patente n.º WO 2005/035693, US 2005101/12735, WO 2007/027633, WO 2006/127512, US 2007/0099278, US 2007/0089356 y WO 2008/067605 se refieren todas a sistemas de producción de biodiésel o biocombustible.

55 L. Dennison presentó en la Society for Advancement of Chicanos and Native Americans en la Science National Conference en octubre de 2007 "Open-pond, saltwater cultivation of microalgae for lipid-based biodiesel fuel production". Esta presentación describía las especies de algas y perfiles de lípidos en cultivos de lago abierto y que han crecido en laboratorio de *Nannochloropsis* sp.

60 J. Casey Lippmeier presentó en la conferencia de la Physiological Society of America Annual de julio de 2008 "Lipid pathways of Schizochytrium (and other algae) and their export to heterologous systems". En esta presentación se describieron los perfiles de ácidos grasos y las actividades de síntesis de ácidos grasos de *Schizochytrium*. También se analizaron los resultados de que los genes de PUFA de *Schizochytrium* se expresaban en *E. coli*, levaduras y *Arabidopsis*. En la misma conferencia anual, Craig A. Weaver presentó "Manipulation of Schizochytrium genes for improved fatty acid production". En esta presentación, presentó los perfiles de ácidos grasos y las actividades de

síntesis de ácidos grasos de *Schizochytrium*. También describió la eliminación de la biosíntesis de caroteno y la introducción de genes de *Thraustochytrium* en *Schizochytrium*.

Recientemente, se ha investigado el crecimiento heterotrófico de la microalga *Chlorella protothecoides* por fermentación con fines de producción de biodiésel. Los investigadores en Tsinghua University en Beijing, China han realizado estudios sobre la producción de biodiésel usando aceite de la microalga heterotrófica *Chlorella protothecoides*. En estos estudios, se cultivaron microalgas en fermentadores usando glucosa o hidrolizado en polvo de maíz como fuentes de carbono. El aceite de microalgas entonces se extrae y se transesterifica para producir biodiésel. Véase, Miao, X. y Wu, Q., *Bioresource Technology* 97: 841-846 (2006); Xu, H. *et al.*, *Journal of Biotechnology* 126: 499-507 (2006). Aunque estos investigadores han sugerido que el almidón y las soluciones hidrolizadas de celulosa pueden ser un sustituto de bajo coste de la glucosa como fuente de carbono en el proceso de fermentación, también han sugerido que la hidrolización de la celulosa es difícil y costosa. Véase, Li, X. *et al.*, "Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoids* through heterotrophic cultivation in bioreactors," *Biotechnology and Bioengineering*, Accepted Preprint, Accepted 20 de abril de 2007

Además del gasóleo, otro combustible basado en aceite que necesita una fuente renovable y sostenible es el combustible de aviones. Las aeronaves dependen del uso de diversos tipos de combustibles de avión, incluyendo combustibles de avión de tipo queroseno y combustibles de avión de tipo nafta. La alta dependencia de la industria de la aviación del suministro limitado de combustibles de avión basados en el petróleo crea una urgente necesidad del descubrimiento de biocombustibles de avión renovables.

Por lo tanto, existe una necesidad de un método de bajo coste y eficaz para producir biocombustibles basados en lípidos que puedan aumentarse fácilmente en escala para remplazar el gasóleo fósil y los combustibles de avión. Como se usa en este documento, "biocombustible basado en lípidos" se refiere a cualquier combustible que se produzca a partir de un aceite biológico de la presente invención incluyendo, aunque sin limitación, biodiésel, biocombustibles de avión y combustibles especializados. Para satisfacer esta necesidad, debe desarrollarse un método barato y simple para producir aceites biológicos que puedan convertirse en biocombustibles basados en lípidos. Para reducir los costes de producción de biocombustibles basados en lípidos existe una necesidad de un método de bajo coste de producción de aceites biológicos a través del uso de materias primas abundantes y baratas, tales como materias básicas que contienen celulosa como fuente de carbono principal. Además de una necesidad de usar materias primas baratas, existe una necesidad de procesos mejorados que también aborden la reducción de costes en la producción de aceites biológicos. Los métodos mejorados de producción de estos aceites biológicos no solamente reducirán el coste de la producción de biocombustibles basados en lípidos, sino que también reducirán los costes asociados con el uso de estos aceites biológicos en muchas otras aplicaciones, incluyendo productos alimenticios, nutricionales y farmacéuticos.

Por ejemplo, se desea aumentar la ingesta en la dieta de muchos nutrientes beneficiosos encontrados en los aceites biológicos. Los nutrientes particularmente beneficiosos incluyen ácidos grasos tales como ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) omega-3 y omega-6 y ésteres de los mismos. Los PUFA omega-3 se reconocen como compuestos de la dieta importantes para prevenir la arterioesclerosis y cardiopatía coronaria, para aliviar las afecciones inflamatorias y para retardar el crecimiento de las células tumorales. Los PUFA omega-6 sirven no solamente como lípidos estructurales en el organismo humano, sino también como precursores de varios factores en inflamación, tales como prostaglandinas, leucotrienos y oxilipinas. Los PUFA de cadena larga omega-3 y omega-6 representa clases importantes de PUFA.

Hay dos series principales o familias de LC-PUFA, dependiendo de la posición del doble enlace más cercano al extremo metilo del ácido graso: la serie omega-3 contiene un doble enlace en el tercer carbono, mientras que la serie omega-6 no tiene un doble enlace hasta el sexto carbono. Por tanto, el ácido docosahexaenoico ("DHA") tiene una longitud de cadena de 22 carbonos con 6 dobles enlaces empezando con el tercer carbono desde el extremo metilo y se denomina "22:6 n-3". Otro LC-PUFA omega-3 importante incluye ácido eicosapentaenoico ("EPA"), que se denomina "20:5 n-3" y el ácido docosapentaenoico omega-3 ("DPA n-37") que se denomina "22:5 n-3". Los LC-PUFA omega-6 importantes incluyen ácido araquidónico ("ARA"), que se denomina "20:4 n-6", y ácido docosapentaenoico omega-6 ("DPA n-6"), que se denomina "22:5 n-6".

Como los seres humanos y muchos otros animales no pueden sintetizar directamente ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6, deben obtenerlos en la dieta. Las fuentes tradicionales en la dieta de PUFA incluyen aceites vegetales, aceites de animales marinos, aceites de pescado y semillas oleaginosas. Además, se ha encontrado que aceites producidos por ciertos microorganismos son ricos en LC-PUFA. Para reducir los costes asociados con la producción de fuentes de la dieta de PUFA, existe una necesidad de un método rentable y eficaz de producción de aceites biológicos que contengan PUFA. Para reducir los costes de aceites biológicos que contienen PUFA, existe una necesidad de desarrollar un método de producción de estos aceites biológicos usando materias primas baratas (tales como materia básica que contiene celulosa) y procesos mejorados que se diseñen para reducir los costes de producción.

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un método para producir un aceite biológico que comprende cultivar un microorganismo del reino *Stramenopile*, donde dicho microorganismo es un traustoquítrido, seleccionado de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, y *Ulkenia*, por fermentación heterotrófica, donde más de un 50 % a un 99 % de los ácidos grasos insaturados en dicho aceite biológico son ácidos grasos poliinsaturados, y donde dicha fermentación se realiza en un fermentador no estéril.

10 En este documento se divulga un método para producir un aceite biológico que comprende cultivar un microorganismo del reino *Stramenopile* donde dicho microorganismo es un traustoquítrido por fermentación heterotrófica usando materia básica que comprende celulosa como fuente de carbono, donde más de un 50 % a un 99 % de los ácidos grasos insaturados en el aceite biológico son ácidos grasos poliinsaturados.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, el microorganismo usado sacarifica la celulosa. Preferiblemente, un microorganismo usado en la presente invención degrada o es resistente a los componentes de la materia básica seleccionados del grupo que consiste en lignina, hemicelulosa, aceite vegetal, polisacáridos extracelulares vegetales y combinaciones de los mismos. El microorganismo usado en la presente invención puede ser un microorganismo modificado genéticamente.

20 Un microorganismo usado en la presente invención puede producir aceite en forma de triglicéridos en una cantidad de un 25 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca. En algunas realizaciones de la presente invención, el cultivo de la biomasa del microorganismo se realiza a una concentración de oxígeno disuelto de un 10 % a un 100 %.

25 La producción de aceite biológico por el microorganismo puede realizarse a una concentración de oxígeno disuelto de, por ejemplo, un 0 % a aproximadamente un 10 %. Los microorganismos pueden crecer a una temperatura de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 45 °C.

30 En algunas realizaciones de la presente invención, el método de producción de aceite biológico comprende además realizar autólisis o lisis inducida del microorganismo después de que el microorganismo haya producido aceite en una cantidad de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 90 % en peso de su biomasa seca. La inducción de la lisis del microorganismo puede conseguirse exponiendo el microorganismo a una condición favorable para la lisis seleccionada del grupo que consiste en un pH, una temperatura, la presencia de una enzima, la presencia de un detergente, alteración física y combinaciones de las mismas.

35 En algunas realizaciones de la presente invención, la materia básica de fermentación que contiene celulosa comprende una fuente de celulosa seleccionada del grupo que consiste en hierba, caña de azúcar, residuos agrícolas, papel residual, aguas residuales, madera, un organismo del reino *Viridiplantae* y combinaciones de las mismas.

40 En algunas realizaciones de la invención, la fermentación se realiza en un fermentador seleccionado del grupo que consiste en fermentadores de polímero reforzado con fibra, fermentadores de compuesto de matriz metálica, fermentadores de compuesto de matriz cerámica, fermentadores de compuesto termoplástico, fermentadores metálicos, fermentadores de acero con carbono recubierto de epoxi, fermentadores de acero con carbono recubierto de plástico, fermentadores de plástico, fermentadores de fibra de vidrio y fermentadores de hormigón.

45 En algunas realizaciones de la presente invención, la fermentación se realiza en un fermentador que está sumergido en agua. La fermentación puede realizarse en fermentadores que tienen sistemas de refrigeración conectados en serie de modo que el efluente de agua de refrigeración de un primer fermentador o un conjunto de fermentadores en la serie se usa como suministro de agua de refrigeración para un segundo fermentador o conjunto de fermentadores en la serie. Asimismo, la fermentación puede realizarse en fermentadores que tienen sistemas de gas conectados en serie de modo que el escape de dispersión de un primer fermentador o un conjunto de fermentadores en la serie se usa como suministro de gas para un segundo fermentador o conjunto de fermentadores en la serie.

50 La presente invención proporciona además un método para producir biodiésel, que comprende (a) un método de acuerdo con la invención, como se describe anteriormente; y (b) transesterificar el aceite biológico para producir biodiésel.

55 La transesterificación del aceite biológico puede realizarse usando un alcohol derivado de un proceso de producción de alcohol. En algunas realizaciones de la presente invención, el glicerol resultante de la transesterificación del aceite biológico puede usarse como fuente de carbono para un posterior proceso de fermentación para producir un alcohol o un aceite biológico. En algunas realizaciones de la presente invención, un proceso de fermentación posterior cultiva un microorganismo que es capaz de usar el glicerol como fuente de carbono.

60 La presente invención también proporciona un método para producir biocombustible de aviones, que comprende (a) un método de acuerdo con la invención, como se describe anteriormente; y (b) craquear el aceite biológico para

producir biocombustible de avión. En algunas realizaciones de la presente invención, el aceite biológico usado para producir biocombustible de avión comprende más de un 50 % a aproximadamente un 75 % en peso de ácidos grasos poliinsaturados.

5 Una composición de biocombustible basado en lípidos producida usando el método de acuerdo con la invención, como se describe anteriormente, puede comprender de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 75 % en peso de ésteres de alquilo de ácidos grasos de cadena larga que tienen 20 o más carbonos. La composición de biocombustible basado en lípidos puede tener una temperatura de fusión de aproximadamente 30 °C a aproximadamente -50 °C.

10 La presente invención también proporciona un método para producir un aceite biológico, que comprende: (a) cultivar dos o más microorganismo de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente, de forma simultánea o secuencial por fermentación heterotrófica, usando materia básica que comprende celulosa como fuente de carbono, donde uno o más de los microorganismos son capaces de sacarificar dicha celulosa.

15 La presente invención proporciona además un método para producir biodiésel, que comprende transesterificar un aceite biológico producido por dos o más microorganismos de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente, que han experimentado fermentación heterotrófica usando materia básica que comprende celulosa como fuente de carbono, donde uno o más de los microorganismos pueden sacarificar la celulosa. Para producir biocombustible de aviones, el craqueo puede realizarse en un aceite biológico producido por dos o más microorganismos de acuerdo con la invención, como se describe anteriormente, que han experimentado fermentación heterotrófica usando materia básica que comprende celulosa como fuente de carbono, donde uno o más de los microorganismos pueden sacarificar la celulosa.

25 En algunas realizaciones de la presente invención, el aceite biológico se produce a una tasa de aproximadamente 5 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día, preferiblemente a una tasa de aproximadamente 30 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día en el fermentador no estéril.

30 En algunas realizaciones de la presente invención, el cultivo de los microorganismos en el fermentador no estéril consigue una densidad celular de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 300 g/l, preferiblemente de aproximadamente 150 g/l a aproximadamente 250 g/l. Preferiblemente, el cultivo del microorganismo comprende usar celulosa como fuente de carbono.

35 En este documento se divulga un método de producción de biocombustible, que comprende: (a) cultivar un microorganismo en un fermentador no estéril para producir un aceite biológico; y (b) transesterificar el aceite biológico para producir biodiésel. También se divulga en este documento un método de producción de biocombustible de aviones, que comprende: (a) cultivar un microorganismo en un fermentador no estéril para producir un aceite biológico; y (b) craquear el aceite biológico para producir biocombustible de aviones.

40 La presente invención proporciona un método de producción de biodiésel, que comprende: (a) cultivar un microorganismo de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente, usando nutrientes que comprenden medios reciclados para producir un aceite biológico; y (b) transesterificar el aceite biológico para producir biodiésel. Los medios reciclados pueden ser, aunque sin limitación, biomasa deslipidada, biomasa hidrolizada, biomasa parcialmente hidrolizada, metales reciclados, sales recicladas, aminoácidos reciclados, carbohidratos extracelulares reciclados, glicerol reciclado, biomasa de levaduras reciclada y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el cultivo del microorganismo comprende usar celulosa como fuente de carbono.

45 La presente invención proporciona además un método de producción de biocombustible de aviones, que comprende: (a) cultivar un microorganismo de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente, usando nutrientes que comprenden medios reciclados para producir un aceite biológico; y (b) craquear el aceite biológico para producir biocombustible de aviones. Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un método de producción de biodiésel, que comprende: (a) cultivar un microorganismo de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente, usando un sistema de fermentación que comprende una fase de siembra continua y una fase de producción de lípidos para producir un aceite biológico; y (b) transesterificar el aceite biológico para producir biodiésel. Preferiblemente, la fase de siembra continua produce biomasa del microorganismo de modo que de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 95 % de la producción de biomasa total del microorganismo se consigue durante la fase de siembra continua. En algunas realizaciones de la presente invención, la fase de producción de lípidos se realiza como un proceso discontinuo. Preferiblemente, la fase de producción de lípidos produce lípidos de modo que de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 95 % de la producción de lípidos total del microorganismo se consigue durante la fase de producción de lípidos. En algunas realizaciones de la presente invención, el cultivo del microorganismo comprende el uso de celulosa como fuente de carbono.

60 La presente invención proporciona además un método de producción de biocombustible de aviones, que comprende: (a) cultivar un microorganismo de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente, usando un sistema de fermentación que comprende una fase de siembra continua y una fase de

producción de lípidos para producir un aceite biológico; y (b) craquear el aceite biológico para producir biocombustible de aviones.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 muestra diversas realizaciones de un método de producción de aceites biológicos y biodiésel de acuerdo con la presente invención.
 La figura 2 muestra un ejemplo de un diseño de sistema de fermentación de acuerdo con la presente invención.
 La figura 3 muestra gráficos del peso celular seco, el porcentaje en peso de lípidos, el porcentaje en peso de DHA y la cantidad de lípidos producida por litro de caldo de fermentación durante el tiempo para el crecimiento de un microorganismo (ATCC 20888) en condiciones estériles y no estériles descritas en el ejemplo 4.
 10 La figura 4 muestra gráficos de la tasa de consumo de azúcar, la tasa de producción de aceite (como gramos por litro de caldo de fermentación por día), la tasa de productividad de biomasa (en gramos por litro por día) y la cantidad de biomasa sin lípidos durante el tiempo para el crecimiento de un microorganismo (ATCC 20888) en condiciones estériles y no estériles descritas en el ejemplo 4.
 15 La figura 5 muestra un diagrama de un proceso de fermentación de dos fases que comprende una fase de siembra continua y una fase de acumulación de lípidos discontinuo.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención proporciona un método para producir un aceite biológico, que comprende cultivar un microorganismo del reino *Stramenophila* donde dicho microorganismo es un traustozófito, seleccionado de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, y *Ulkenia*, por fermentación heterotrófica, donde más de un 50 % a un 99 % de los ácidos grasos insaturados en dicho aceite biológico son ácidos grasos poliinsaturados, y donde dicha
 25 fermentación se realiza en un fermentador no estéril. Algunas realizaciones del método de la presente invención proporcionan organismos heterotróficos oleaginosos y procesos adecuados para convertir el carbono, mediante fermentación, de sacáridos directamente basados en celulosa o basados en lignocelulosa en aceite vegetal para la fabricación de biodiésel. Los procesos de la presente invención tendrían mayor capacidad de cambio de escala, más sostenibles y generarían un biodiésel más competitivo en costes que los procesos actualmente usados o
 30 investigados (tal como biodiésel de aceite de semillas o biodiésel de algas fotosintéticas).

En este documento se divulga además el crecimiento de alta densidad de dos microorganismos oleaginosos usando materias básicas celulósicas sacarificadas. Por ejemplo, el protista *Schizochytrium* sp y la levadura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* son adecuados para dichos procesos porque ambos tienen sistemas de transformación bien
 35 desarrollados para modificar los microorganismos y pueden producir altos niveles de lípidos por fermentación. También se divulgan traustozófitos oleaginosos y hongos que pueden crecer en una diversidad de sustratos celulósicos y lignocelulósicos, y organismos que pueden ser susceptibles de forma natural a sacarificación y fermentación combinadas, así como degradación de lignina o resistencia.

40 La presente invención también puede usar cepas mejoradas de los microorganismos de la reivindicación 1 y procesos para utilizar sustratos basados en celulosa para la producción de aceite mediante medios moleculares, biológicos, genéticos clásicos y fisiológicos. Algunas realizaciones de la presente invención pueden proporcionar un aumento de escala económico de un proceso de fermentación para convertir acilglicéridos celulares en biodiésel. En este documento se divulgan diseños de reactor biológico y químico y construcciones, así como estrategias de
 45 producción comercial para la implementación de los métodos de la invención.

En la presente divulgación, los organismos incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en algas doradas (tales microorganismos del reino *Stramenopiles*), algas verdes, diatomeas, dinoflagelados (tales como microorganismos del orden *Dinophyceae*, incluyendo miembros el género *Cryptocodinium* tal como, por ejemplo, *Cryptocodinium cohnii*), levaduras tal como un miembro de los géneros *Yarrowia* (tales como *Yarrowia lipolytica*), *Cryptococcus* (tal como *Cryptococcus albidus*), *Trichosporon*, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodospidium*, y *Rhodotorula*), y hongos de los géneros *Mucor* y *Mortierella*, incluyendo, aunque sin limitación *Mortierella alpina* y *Mortierella sect. schmuckeri*. Los miembros del grupo microbiano *Stramenopiles* incluyen microalgas y microorganismos de tipo alga, incluyendo los siguientes grupos de microorganismos: Hamatores, proteromónadas, opalinos, Devalpayella, Diplophrys, labrintúlidos, traustozófitos, biosécidos, oomicetos, hipoquitrídicetos, Commaton, Reticulospaera, pelagomonas, Pelagococcus, Ollicola, Aureococcus, parmales, diatomeas, xantofitos, feofitos (algas pardas), eustigmatofitos rafidofitos, sinúridos, axodinos (incluyendo *Rhizochromulinales*, *Pedinellales*, *Dictyochales*), crisomeridales, sarcinocrisidales, hidrurales, hiberdiales y cromulinales. Los traustozófitos incluyen los géneros *Schizochytrium* (las especies incluyen *aggregatum*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum*, *octosporum*), *Thraustochytrium* (las especies incluyen *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum*, *striatum*), *Ulkenia* (las especies incluyen *amoeboida*, *keruelensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrids*, *visurgensis*, *yorkensis*), *Aplanochytrium* (las especies incluyen *halitidis*, *keruelensis*, *profunda*, *stocchinoi*), *Japonochytrium* (las especies incluyen *marinum*), *Althornia* (las especies incluyen *crouchii*) y *Elina* (las especies incluyen *marisalba*, *sinorifica*). Los labrintúlidos incluyen los géneros *Labyrinthula* (las especies incluyen *algeriensis*, *coenocystis*, *chattonii*, *macrocystis*, *macrocystis atlantica*, *macrocystis macrocystis*, *marina*, *minuta*, *roscoffensis*, *valkanovii*, *vitellina*, *vitellina pacifica*,

vitellina vitellina, *zopfi*), *Labyrinthomyxa* (las especies incluyen *marina*), *Labyrinthuloides* (las especies incluyen *haliotidis*, *yorkensis*), *Diplophrys* (las especies incluyen *archeri*), *Pyrrhosorus** (las especies incluyen *marinus*), *Sorodiplophrys** (las especies incluyen *stercorea*), *Chlamydomyxa** (las especies incluyen *labyrinthuloides*, *montana*). (* = no hay consenso general actual sobre la colocación taxonómica exacta de estos géneros).

Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un método para producir un aceite biológico, que comprende cultivar un microorganismo de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* o *Ulkenia* de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente por fermentación heterotrófica usando materia básica que comprende celulosa como fuente de carbono. En algunas realizaciones de la presente invención, el aceite biológico contiene ácidos grasos insaturados de los cuales una parte significativa es ácidos grasos poliinsaturados. Como se describe previamente, determinados ácidos grasos poliinsaturados tales como ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 y omega-6 son compuestos de la dieta particularmente importantes. Por lo tanto, es deseable producir un aceite biológico con una cantidad significativa de ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones de la presente invención, los aceites biológicos se convierten en biocombustibles basados en lípidos. Para dichas aplicaciones, puede ser deseable producir hidrocarburos de diversas longitudes de cadena, particularmente para aplicaciones de biocombustible de avión. La presencia de cantidades significativas de ácidos grasos poliinsaturados en los aceites biológicos usados para producir biocombustibles basados en lípidos proporcionará mayor flexibilidad y variedad para la producción de hidrocarburos ya que los múltiples sitios de insaturación en un ácido graso poliinsaturado proporcionan múltiples sitios para la escisión para fabricar hidrocarburos. Por ejemplo, determinados combustibles de avión requieren hidrocarburos con dos a ocho carbonos. Los ácidos grasos poliinsaturados pueden escindirse a través de procesos conocidos en la técnica, tales como craqueo, para producir hidrocarburos más cortos de diversas longitudes de cadena.

Los aceites biológicos producidos a través de los métodos de la presente invención tienen ácidos grasos insaturados donde más de un 50 % a un 99 % de los ácidos grasos insaturados en el aceite biológico son ácidos grasos poliinsaturados. Los aceites biológicos producidos por la presente invención pueden contener ácidos grasos insaturados donde de aproximadamente un 51 % a un 99 %, de aproximadamente un 60 % a un 99 %, de aproximadamente un 70 % a un 99 %, de aproximadamente un 80 % a un 99 % o de aproximadamente un 90 % a un 99 % de los ácidos grasos insaturados en el aceite biológico son ácidos grasos poliinsaturados. En la presente invención, más de un 50 %, más de aproximadamente un 60 %, más de aproximadamente un 70 %, más de aproximadamente un 80 % o más de aproximadamente un 90 % de los ácidos grasos insaturados en el aceite biológico son ácidos grasos poliinsaturados.

En algunas realizaciones de la presente invención, el aceite biológico comprende más de un 50 % a aproximadamente un 75 % en peso de ácidos grasos poliinsaturados. Para determinados usos, el aceite biológico preferiblemente comprende más de un 50 % a aproximadamente un 75 % o de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 75 % en peso de ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones de la presente invención, el aceite biológico comprende más de un 50 %, al menos aproximadamente un 60 % o al menos aproximadamente un 70 % en peso de ácidos grasos poliinsaturados. Los métodos de producción de un aceite biológico de acuerdo con la presente invención opcionalmente pueden comprender además recoger el aceite biológico del microorganismo.

Como se usa en este documento, "celulosa" incluye celulosa no sacarificada o no hidrolizada, así como celulosa sacarificada o hidrolizada.

La presente invención contempla además el uso de una combinación de dos o más microorganismos de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente, para producir un aceite biológico o una mezcla de aceites biológicos. Para reducir los costes de fermentación, dos o más microorganismos se cultivan preferiblemente en las mismas condiciones de fermentación. Cuando se combinan dos o más microorganismos diferentes para producir el aceite biológico, uno o más microorganismos pueden acumular aceite durante la fermentación. Uno o más microorganismos pueden facilitar el cultivo y la acumulación de aceite por otro microorganismo a través de una actividad tal como, aunque sin limitación, la descomposición de los componentes de la materia básica en monómeros de azúcar útiles (tal como la sacarificación de la celulosa), la descomposición de componentes de la materia básica que inhiben el crecimiento de otro microorganismo (tal como el metabolismo o la degradación de componentes de la materia básica tales como lignina, hemicelulosa (tal como xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano), aceites vegetales, polisacáridos extracelulares vegetales, etc.) y la síntesis de componentes que promueven el crecimiento de otro microorganismo (tal como a través de la síntesis de determinadas enzimas que facilitan el crecimiento del microorganismo).

En este documento se divulgan organismos adecuados para la metabolización de la hemicelulosa que incluyen, aunque sin limitación, *Fibrobacter succinogenes* y levaduras de los géneros *Cryptococcus* (tales como *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus curvatus*), *Trichosporon*, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodospidium* y *Rhodotorula*. Otros organismos adecuados para la metabolización de la hemicelulosa incluyen especies de *Pichia* (tal como *Pichia stipitis*), *Aeromonas*, *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Bacillus* (tal como *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis* y *Bacillus lentis*), *Echerichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* y organismos de los géneros *Trichoderma*. Los organismos adecuados para la metabolización de la lignina incluyen, aunque sin limitación, *Phanerochaete*

chryso sporium y otros hongos de "putrefacción blanca". La publicación de solicitud de patente n.º WO 91/018974 divulga ejemplos de organismos que tienen actividad hemicelulosa.

Los métodos adecuados para generar azúcares libre y oligosacáridos a partir de biomasa lignocelulósica se divulgan, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente n.º US 2004/0005674. Estos métodos implican convertir biomasa lignocelulósica en azúcares libres y oligosacáridos pequeños con enzimas (tales como celulasas, xilanasas, ligninasas, amilasas, proteasas, lipidasas y glucuronidasas) que descomponen la lignocelulosa. Estas enzimas pueden comprarse de una fuente comercial o producirse de forma recombinante, tal como por expresión en microorganismos, hongos, es decir, levaduras, o plantas.

Los microorganismos oleaginosos para su uso en la presente invención se definen en la reivindicación 1. Como se usa en este documento, "microorganismos oleaginosos" se definen como microorganismos que pueden acumular más de un 20 % del peso seco de sus células en forma de lípidos. En algunas realizaciones de la presente invención, un microorganismo produce de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 95 % en peso de su biomasa seca como lípidos. Preferiblemente, un microorganismo de la presente invención produce de aproximadamente un 35 % a aproximadamente un 93 %, de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 88 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 85 %, de aproximadamente un 55 % a aproximadamente un 83 %, de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 80 %, de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 78 % o de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 75 % en peso de su biomasa seca como lípidos. En algunas realizaciones de la presente invención, el microorganismo produce al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 % o al menos aproximadamente un 70 % en peso de su biomasa seca como lípidos.

Cuando se usan dos o más microorganismos para producir los aceites biológicos en la presente invención, uno o más microorganismos pueden producir aceites biológicos. En algunas realizaciones de la presente invención, cuando se combinan dos o más microorganismos para producir aceites biológicos, la relación de la cantidad de aceite producido por un primer microorganismo la cantidad de aceite producido por un segundo microorganismo, medida en peso, es de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 1:1, de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 2:3, de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 3:7 o de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 1:4.

Preferiblemente, un microorganismo usado en la presente invención produce aceite en forma de triglicéridos en una cantidad de aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 35 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 55 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 80 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 80 % en peso de su biomasa seca o de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 75 % en peso de su biomasa seca. En algunas realizaciones de la presente invención, el microorganismo produce aceite en forma de triglicéridos en una cantidad de al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 % o al menos aproximadamente un 70 % en peso de su biomasa seca.

Como se usa en este documento un "triglicérido" es un éster de tres restos de ácido graso y glicerol que tiene una fórmula química general de $\text{CH}_2(\text{OOCR}^1)\text{CH}(\text{OOCR}^2)\text{CH}_2(\text{OOCR}^3)$, donde cada uno de OOCR^1 , OOCR^2 y OOCR^3 representa un resto de ácido graso. En algunas realizaciones de la presente invención, los triglicéridos adecuados pueden contener al menos un PUFA. En algunas realizaciones, el PUFA tiene una longitud de cadena de al menos 18 carbonos. Dichos PUFA se mencionan en este documento como PUFA de cadena larga o LC-PUFA. En algunas realizaciones, el PUFA puede ser ácido docosahexaenoico C22:6 n-3 (DHA), ácido docosapentaenoico C22:5 n-3 omega-3 (DPA(n-3)), ácido docosapentaenoico C22:5 n-6 omega-6 (DPA(n-6)), ácido araquidónico C20:4 n-6 (ARA), ácido eicosapentaenoico C20:5 n-3 (EPA), ácido estearidónico (SDA), ácido linolénico (LLA), ácido alfa linolénico (ALA), ácido gamma linolénico (GLA), ácido linolénico conjugado (CLA), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), ácido homo-alfa y gamma linolénico (C20:3 n-6 y 20:3 n-3), ácido adrénico (C22:4 n-6), ácido octacosaoctanoico (C28:8) o mezclas de los mismos. Los PUFA también pueden estar presentes en cualquiera de las formas habituales encontradas en los lípidos naturales incluyendo, aunque sin limitación, triacilgliceroles, diacilgliceroles, monoacilgliceroles, fosfolípidos, ácidos grasos libres o en formas derivadas naturales o sintéticas de estos ácidos grasos (por ejemplo, sales de calcio de ácidos grasos y similares). Una referencia a un aceite u otra composición que comprenda triglicéridos que tienen restos de PUFA, como se usa en la presente invención, puede hacer referencia a una composición que comprende triglicéridos que tienen únicamente un único tipo de resto de PUFA tal

como DHA o una composición que comprende triglicéridos que tiene una mezcla de más de un tipo de restos de PUFA tal como DHA, EPA y ARA.

En realizaciones preferidas de la presente invención, los microorganismos tienen capacidad de crecimiento celular de alta densidad. En algunas realizaciones de la presente invención, los microorganismos pueden conseguir una densidad celular de al menos aproximadamente 10 g/l, al menos aproximadamente 15 g/l, al menos aproximadamente 20 g/l, al menos aproximadamente 25 g/l, al menos aproximadamente 30 g/l, al menos aproximadamente 50 g/l, al menos aproximadamente 75 g/l, al menos aproximadamente 100 g/l, al menos aproximadamente 125 g/l, al menos aproximadamente 135 g/l, al menos aproximadamente 140 g/l, al menos aproximadamente 145 g/l o al menos aproximadamente 150 g/l. En algunas realizaciones de la presente invención, los microorganismos pueden conseguir una densidad celular de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 15 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 75 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 100 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 125 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 130 g/l a aproximadamente 290 g/l, de aproximadamente 135 g/l a aproximadamente 280 g/l, de aproximadamente 140 g/l a aproximadamente 270 g/l, de aproximadamente 145 g/l a aproximadamente 260 g/l o de aproximadamente 150 g/l a aproximadamente 250 g/l. El crecimiento de alta densidad de los microorganismos usados en la presente invención puede aumentarse ajustando las condiciones de fermentación (tales como temperatura, pH, concentración de iones y concentraciones de gas).

La presente invención proporciona producción altamente eficaz de los aceites biológicos. En algunas realizaciones de la presente invención, la cantidad de aceite biológico producido es de al menos aproximadamente 5 g/l/día, al menos aproximadamente 10 g/l/día, al menos aproximadamente 20 g/l/día, al menos aproximadamente 30 g/l/día, al menos aproximadamente 40 g/l/día, al menos aproximadamente 50 g/l/día, al menos aproximadamente 60 g/l/día o al menos aproximadamente 70 g/l/día. En algunas realizaciones de la presente invención, la cantidad de aceite biológico producidos es de aproximadamente 5 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día, de aproximadamente 10 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día, de aproximadamente 20 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día o de aproximadamente 30 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día.

En algunas realizaciones de la presente invención, el microorganismo usado para la producción del aceite biológico es un microorganismo celulolítico y, por lo tanto, puede sacarificar la celulosa de materias básicas celulósicas o lignocelulósicas. Las materias básicas celulósicas o lignocelulósicas incluyen cualquier fuente que comprenda celulosa. Estas incluyen, aunque sin limitación, gramíneas, caña de azúcar, residuos agrícolas, papel residual, aguas residuales, madera y cualquier organismo en el reino *Viridiplantae* o productos del mismo. Preferiblemente, la celulosa usada es de una fuente diferente a fuentes de celulosa basadas en árboles. Los tipos de gramíneas útiles como fuente de celulosa incluyen, aunque sin limitación, pasto sierra, pasto de trigo, pasto de arroz, pasto varilla y pastos de tipo *Miscanthus*.

Para que un microorganismo use celulosa como fuente de carbono, la celulosa debe descomponerse en sus monómeros de azúcar constituyentes. La celulosa es un polímero de glucosa unido por enlaces beta-glucosídicos que proporcionan una estructura lineal altamente estable. La descomposición de la celulosa en monómeros de azúcar (también mencionado como sacarificación de la celulosa) es un reto difícil y se han hecho muchos intentos por conseguirlo. La hidrólisis enzimática de la celulosa por celulasas es una estrategia para degradar la celulosa. Una hidrólisis completa de la celulosa generalmente requiere: una endoglucanasa, que escinde las regiones interiores de polímeros de celulosa; una exoglucanasa, que escinde las unidades de celobiosa desde los extremos de polímeros de celulosa; y una beta-glucosidasa, que escinde la celobiosa en sus subunidades de glucosa. Las celulasas pueden tener múltiples complejos que consiguen las actividades de una endoglucanasa, una exoglucanasa y una beta-glucosidasa. *Trichoderma reesei* es un organismo importante usado para la producción de celulasas. Otros métodos de composición de la celulosa en monómeros de azúcar incluyen alteraciones termoquímicas (con o sin alteraciones mecánicas), incluyendo agua caliente, explosión de vapor, tratamientos ácidos y/o explosión de fibras con amoníaco.

En algunas realizaciones de la presente invención, el microorganismo que se cultiva para producir el aceite biológico es el mismo microorganismo que sacarifica la celulosa. En algunas realizaciones de la presente invención, pueden cultivarse dos o más microorganismos de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente, de forma simultánea o secuencial para producir aceites biológicos usando materia básica que contiene celulosa como fuente principal de carbono. De acuerdo con la presente invención cuando se fermentan dos o más microorganismos de forma simultánea o secuencial, uno o más de los microorganismos puede sacarificar la celulosa. En algunas realizaciones de la presente invención, un microorganismo de acuerdo con el método de la invención, como se describe anteriormente, puede experimentar fermentación heterotrófica en presencia de una celulasa para potenciar la sacarificación de la celulosa durante la fermentación. En algunas realizaciones, al menos uno de los microorganismos es preferiblemente un miembro del grupo habitualmente llamado traustocáritidos.

Los microorganismos adecuados para su uso en la presente invención también pueden ser tolerantes a altas temperaturas y/o entornos muy ácidos o básicos de modo que su crecimiento no se inhiba y, en algunos casos,

incluso se potencie por altas temperaturas y/o medios ácidos. En algunas realizaciones de la presente invención, un microorganismo se cultiva por fermentación heterotrófica usando materia básica que contiene celulosa a una temperatura y/o un pH que facilita la degradación de la celulosa. En algunas realizaciones de la presente invención, la fermentación se realiza a una temperatura de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C o de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 35 °C. En realizaciones adicionales de la presente invención, la fermentación se realiza a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 11, de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, de aproximadamente 4 a aproximadamente 9,5, de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 o de aproximadamente 6 a aproximadamente 9. El pretratamiento de materias básicas que contienen celulosa usando, por ejemplo, celulasas, alteraciones químicas y/o mecánicas y explosiones de fibras con amoniaco también puede realizarse antes de usar las materias básicas en la producción de los aceites biológicos producidos en la presente invención. Como alternativa, no es necesario dicho pretratamiento.

Algunos ejemplos de métodos de pretratamiento de la materia básica se divulgan en las publicaciones de solicitud de patente n.º US 2007/0161095, WO 05/053812, WO 06/086757, US 2006/0182857, US 2006/177551; US 2007/0110862, WO 06/096834, WO 07/055735, US 2007/0099278, WO 06/119318, US 2006/0172405 y US 2005/0026262.

Los ejemplos de enzimas adecuadas para la digestión de la celulosa se divulgan en las publicaciones de patente o de solicitud de patente n.º US 2003/0096342, WO 03/012109, US 7059993, WO 03/012095, WO 03/012090, US 2003/0108988, US 2004/0038334, US 2003/0104522, EP 1612267 y WO 06/003175

En algunas realizaciones de la presente invención, la materia básica celulósica que se usa para cultivar un microorganismo comprende celulosa en una cantidad de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 100 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 85 %, de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 80 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 75 % o de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 70 % en peso seco de la materia básica de carbono. En algunas realizaciones de la presente invención, la materia básica celulósica comprende celulosa en una cantidad de al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 % o al menos aproximadamente un 70 % del peso seco de la materia básica de carbono.

Preferiblemente, el microorganismo usado en la presente invención es resistente a o degrada los componentes de la materia básica tales como lignina, xilano, hemicelulosa, aceite vegetal, polisacáridos extracelulares vegetales y combinaciones de los mismos. La degradación de o la resistencia a estos componentes de la materia básica asegura que el rendimiento de la fermentación del microorganismo no se inhibirá por la presencia de estos componentes.

En algunas realizaciones de la presente invención, la materia básica celulósica usada para cultivar un microorganismo comprende de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 50 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 % en peso de un componente seleccionado de lignina, hemicelulosa o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones de la presente invención, la materia básica celulósica usada para cultivar el microorganismo comprende al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 % o al menos aproximadamente un 30 % en peso de un componente seleccionado de lignina, hemicelulosa o una combinación de los mismos.

Los organismos adecuados pueden obtenerse de varias fuentes disponibles, incluyendo por recogida del entorno natural. Como se usa en este documento, cualquier organismo, o cualquier tipo específico de organismo, incluye cepas silvestres, mutantes o tipos recombinantes.

Las condiciones de crecimiento en que cultivar o hacer crecer estos organismos son conocidas en la técnica, y las condiciones de crecimiento apropiadas para al menos algunos de estos organismos se divulgan en, por ejemplo, la patente de estos unidos n.º 5.130.242, la patente de Estados Unidos n.º 5.407.957, la patente de Estados Unidos n.º 5.397.591, la patente de Estados Unidos n.º 5.492.938, la patente de Estados Unidos n.º 5.711.983 y la patente de Estados Unidos n.º 6.607.900.

Cuando se usan aceites microbianos, los microorganismos se cultivan en medio eficaz, definido en este documento como cualquier medio que pueda promover la producción de aceite. Preferiblemente, el medio eficaz también promueve el rápido crecimiento microbiano. Los microorganismos pueden cultivarse en modos de fermentación convencionales que incluyen, aunque sin limitación, discontinuo, semidiscontinuo, semicontinuo y continuo. Como se usa en este documento, un modo "semicontinuo" se refiere a un modo fermentación en que una parte del cultivo de fermentación que contiene microorganismos no se recoge del fermentador después de completarse un proceso de fermentación. La parte del cultivo de fermentación que permanece en el fermentador puede servir para inocular un posterior proceso de fermentación. En algunas realizaciones de la presente invención, de aproximadamente un 1 %

a aproximadamente un 50 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 25 % de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 % o de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 8 % en volumen del cultivo de fermentación no se recoge después de completarse el proceso de fermentación, y se deja que permanezca en el fermentador para inocular un posterior proceso de fermentación.

En algunas realizaciones de la presente invención, el proceso de fermentación comprende una primera fase que aborda la acumulación de biomasa del microorganismo y una segunda fase que aborda la acumulación de lípidos por el microorganismo. Preferiblemente, no hay limitación de nutrientes durante la fase de acumulación de biomasa. La fase de acumulación de lípidos se realiza preferiblemente con limitación de nitrógeno con un suministro de carbono.

Los métodos de la presente invención para producir biodiésel pueden comprender (a) cultivar un microorganismo de acuerdo con el método de la invención, como se describe previamente, usando un sistema de fermentación que comprende una fase de siembra continua y una fase de producción de lípidos para producir un aceite biológico y (b) convertir el aceite biológico en biodiésel a través de medios conocidos en la técnica, tal como a través de transesterificación del aceite biológico para producir biodiésel. La fase de siembra continua aborda la acumulación de biomasa y se realiza proporcionando suministro continuo de nutrientes al recipiente de siembra (el recipiente con la inoculación inicial). El caldo de fermentación del recipiente de siembra se extrae y se transfiere a un recipiente de la fase de producción de lípidos, que puede procesarse como un proceso semidiscontinuo donde se suministra una fuente de carbono al lote para mantener una concentración de azúcar diana durante todo el procesamiento.

Puede usarse un proceso de fermentación de dos fases similar para producir aceite biológico para la producción de biocombustible de aviones. En algunas realizaciones de la presente invención, los métodos de producción de biocombustible de aviones comprenden convertir el aceite biológico producido usando este sistema de fermentación en biocombustible de aviones por métodos conocidos en la técnica, utilizando procesos tales como craqueo para ayudar a transformar el aceite biológico en un biocombustible de aviones.

El proceso de fermentación de dos fases aumenta la eficacia del proceso de producción de aceite biológico y, por lo tanto, contribuye a disminuir el coste de la producción de biocombustible basado en lípidos. Este sistema de fermentación mejorado para la producción de biocombustible basado en lípidos es particularmente ventajoso para maximizar la producción eficaz a gran escala de aceites biológicos y, por lo tanto, hace una contribución significativa para producir biocombustible basado en lípidos a partir de aceites biológicos de forma comercialmente más factible. El proceso de fermentación de dos fases puede usarse para producir aceite biológico con alto o bajo contenido de ácido graso poliinsaturado, dependiendo de las necesidades de una aplicación específica.

En algunas realizaciones de la presente invención, la fase de acumulación de biomasa (tal como la fase de siembra continua) produce biomasa del microorganismo de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 95 % o de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 95 % de la producción de biomasa total del microorganismo se consigue durante la fase de acumulación de biomasa. En realizaciones adicionales de la presente invención, de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 95 % o de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 95 % de la producción de biomasa total del microorganismo se consigue durante la fase de acumulación de biomasa. En algunas realizaciones de la presente invención, la fase de acumulación de biomasa produce biomasa del microorganismo de modo que al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % de la producción de biomasa total del microorganismo se consigue durante la fase de acumulación de biomasa. Preferiblemente, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 95 % de la producción de biomasa total del microorganismo se consigue durante la fase de acumulación de biomasa.

En algunas realizaciones de la presente invención, la fase de acumulación de lípidos produce lípidos de modo que de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 95 % o de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 95 % de la producción de lípidos total del microorganismo se consigue durante la fase de acumulación de lípidos. En realizaciones adicionales de la presente invención, de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 95 %, de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 95 % o de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 95 % de la producción de lípidos total del microorganismo se consigue durante la fase de acumulación de lípidos. En algunas realizaciones de la presente invención, la fase de acumulación de lípidos produce lípidos de modo que al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % de la producción de lípidos total del microorganismo se consigue durante la fase de acumulación de lípidos.

Preferiblemente, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 95 % de la producción de lípidos total del microorganismo se consigue durante la fase de acumulación de lípidos.

Los microorganismos modificados genéticamente también son adecuados para la presente invención. Los microorganismos para su uso en la presente invención pueden modificarse genéticamente para potenciar su capacidad de producir aceites biológicos a costes reducidos (por ejemplo, a través de una capacidad potenciada de usar materia básica basada en celulosa como fuente principal de carbono). Estos microorganismos modificados genéticamente pueden incluir, aunque sin limitación, microorganismos que se han modificado genéticamente para tener una capacidad potenciada de sacarificar celulosa o materia básica celulósica, para tener producción aumentada de aceite, para tener la capacidad de degradar lignina o ser resistente a lignina, o de crecer en condiciones de cultivo que no son óptimas para el organismo de tipo silvestre correspondiente (tales como altas temperaturas, o medios muy ácidos). Por ejemplo, un microorganismo puede modificarse genéticamente para introducir o potenciar las actividades de una endoglucanasa, una exoglucanasa y/o una beta-glucosidasa.

Los genes de organismos usados para desarrollar celulasas pueden introducirse en un microorganismo para potenciar su capacidad de sacarificar la celulosa. Por ejemplo, los genes que codifican componentes de celulasas de organismos de los géneros *Trichoderma*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermobifida*, *Acidothermus*, *Schizochytrium* o *Thraustochytrium* pueden introducirse en un microorganismo a través de técnicas genéticas recombinantes para producir un microorganismo que pueda sacarificar directamente la celulosa. Preferiblemente, los genes que codifican componentes de celulasa de las especies *Trichoderma reesei*, *Clostridium thermocellum*, *Acidothermus cellulolyticus*, o *Schizochytrium aggregatum* se introducen y expresan en microorganismos usados en la presente invención. En algunas realizaciones de la presente invención, se clona una celulasa de un organismo en un organismo diferentes. Las técnicas de transformación genética para microorganismos son bien conocidas en la técnica y se analizan, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press. Una técnica general para la transformación de dinoflagelados, que puede adaptarse para su uso con *Cryptocodinium cohnii*, se describe en detalle en Lohuis y Miller, *The Plant Journal* (1998) 13(3): 427-435. Una técnica general para la transformación genética de traustocitridos se describe en detalle en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20030166207, publicada el 4 de septiembre de 2003.

En algunas realizaciones de la presente invención, la fermentación de los microorganismos para producir aceites biológicos se realiza en bajas concentraciones de oxígeno disuelto. La capacidad de los microorganismos de crecer y producir aceite a bajas concentraciones de oxígeno disuelto reduce la introducción de energía en la fermentación y, por lo tanto, también reduciría el coste de la fermentación. En algunas realizaciones de la presente invención, el cultivo de la biomasa del microorganismo (fase de acumulación de biomasa) se realiza a una concentración de oxígeno disuelto de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 100 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 100 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 80 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 70 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 60 %, de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 50 % o de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 40 %. La producción de aceite biológico por el microorganismo (la fase de acumulación de lípidos) puede realizarse a una concentración de oxígeno disuelto de, por ejemplo, un 0 % a aproximadamente un 10 %, de un 0 % a aproximadamente un 8 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 %.

Para reducir los costes de energía asociados con la refrigeración de los fermentadores, los microorganismos usados en la presente invención son preferiblemente tolerantes a la temperatura sobre un amplio intervalo de temperaturas. En algunas realizaciones de la presente invención, los microorganismos pueden crecer y producir aceite a una temperatura de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 45 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 45 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 45 °C o de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 45 °C.

Convencionalmente, la fermentación de un microorganismo se realiza habitualmente en un entorno estéril para evitar contaminantes que puedan interferir con el crecimiento de la biomasa y/o la acumulación de lípidos del microorganismo. La realización de la fermentación en condiciones estériles aumenta el coste de la producción de aceite biológico a partir de los microorganismos, para minimizar el coste de fermentación, la presente invención proporciona la solución inesperada de producir los aceites biológicos por fermentación en fermentadores no estériles. El uso de fermentadores no estériles para producir aceite a partir de un microorganismo es especialmente adecuado para la producción de aceites con fines de biocombustible basado en lípidos ya que reduce significativamente los costes de producción de aceite y hace que la producción de biocombustible basado en lípidos sea comercialmente más viable. Los fermentadores no estériles pueden usarse para producir aceites biológicos con alto o bajo contenido de ácido graso poliinsaturado, dependiendo de las necesidades para una aplicación específica.

Preferiblemente, podrían emplearse fermentadores de bajo coste en las fermentaciones, incluyendo fermentadores de polímero reforzado con fibra, fermentadores de compuesto de matriz metálica, fermentadores de compuesto de matriz cerámica, fermentadores de compuesto termoplástico, fermentadores metálicos, fermentadores de acero con carbono recubierto de epoxi, fermentadores de acero con carbono recubierto de plástico, fermentadores de plástico, fermentadores de fibra de vidrio, fermentadores de hormigón y fermentadores hechos de polímeros (tal como

polipropileno (PP), polietileno de alta densidad (HDPE), policarbonato (PC), poliestireno (PS), poli(cloruro de vinilo) (PVC), kynar y nailon). El fermentador de bajo coste también puede estar hecho de una combinación de los materiales anteriores. También puede emplearse limpieza de tanque de bajo coste de acuerdo con la presente invención para reducir adicionalmente los costes de fermentación. La limpieza del tanque de bajo coste incluye, aunque sin limitación, el uso de metóxido o etóxido para limpiar químicamente los tanques de fermentación.

En algunas realizaciones de la presente invención, el aceite biológico se produce a una tasa de aproximadamente 5 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día, en un fermentador no estéril. Preferiblemente, la cantidad de aceite biológico producido en un fermentador no estéril es de al menos aproximadamente 5 g/l/día, al menos aproximadamente 10 g/l/día, al menos aproximadamente 20 g/l/día, al menos aproximadamente 30 g/l/día, al menos aproximadamente 40 g/l/día, al menos aproximadamente 50 g/l/día, al menos aproximadamente 60 g/l/día o al menos aproximadamente 70 g/l/día. En algunas realizaciones de la presente invención, la cantidad de aceite biológico producido en un fermentador no estéril es de aproximadamente 10 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día, de aproximadamente 20 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día o de aproximadamente 30 g/l/día a aproximadamente 70 g/l/día.

El cultivo del microorganismo en un fermentador no estéril consigue preferiblemente una alta densidad celular de al menos aproximadamente 10 g/l, al menos aproximadamente 15 g/l, al menos aproximadamente 20 g/l, al menos aproximadamente 25 g/l, al menos aproximadamente 30 g/l, al menos aproximadamente 50 g/l, al menos aproximadamente 75 g/l, al menos aproximadamente 100 g/l, al menos aproximadamente 125 g/l, al menos aproximadamente 135 g/l, al menos aproximadamente 140 g/l, al menos aproximadamente 145 g/l, al menos aproximadamente 150 g/l o al menos aproximadamente 200 g/l. En algunas realizaciones de la presente invención, los microorganismos que experimentan fermentación en un fermentación no estéril pueden conseguir una densidad celular de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 15 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 75 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 100 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 125 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 130 g/l a aproximadamente 290 g/l, de aproximadamente 135 g/l a aproximadamente 280 g/l, de aproximadamente 140 g/l a aproximadamente 270 g/l, de aproximadamente 145 g/l a aproximadamente 260 g/l o de aproximadamente 150 g/l a aproximadamente 250 g/l.

En algunas realizaciones de la presente invención, pueden utilizarse cambios en las condiciones de fermentación del microorganismo (tal como pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, relaciones de iones, etc.) para alterar el perfil de ácidos grasos del aceite resultante dependiendo del uso pretendido del aceite biológico. De acuerdo con el uso pretendido de los aceites biológicos producidos usando la presente invención, las condiciones de fermentación pueden ajustarse, por ejemplo, para promover o impedir la producción de lípidos en forma de triglicéridos por los microorganismos, para promover o impedir la producción de ácidos grasos específicos o mezclas de ácidos grasos por los microorganismos (tales como ácidos grasos de una longitud de cadena específica o grado de insaturación), para promover o impedir la producción de aceites que proporcionen un alto o bajo nivel de energía por unidad de volumen del aceite, o para promover o impedir a acumulación de determinados subproductos en los aceites producidos por los microorganismos. Los diferentes usos de los aceites biológicos producidos usando la presente invención con fines de biocombustible basado en lípidos incluyen, aunque sin limitación, usos como aceite de calefacción, biocombustible de transporte, combustible de aviones y aditivos de combustible. En algunas realizaciones de la presente invención, puede utilizarse deuterio en el medio de fermentación para facilitar la producción de combustibles especializados de muy alto volumen y muy alto valor o lubricantes. En algunas realizaciones de la presente invención, la conversión de aceites biológicos en biocombustibles basados en lípidos implica procesos químicos y técnicas de refinado conocidos en la técnica que también pueden producir o usarse para producir compuestos químicos especializados similares a destilados del petróleo (tales como componentes de plástico).

El beneficio de la venta de estos agentes químicos especializados también podría compensar los costes de la producción de biocombustibles basados en lípidos. Se contemplan otros diversos usos de los aceites biológicos dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, los aceites biológicos producidos usando la presente invención pueden usarse en cualquier producto alimenticio, nutricional o farmacéutico adecuado.

La presente invención también proporciona métodos para fermentar los microorganismos en tanques de fermentación que se sumergen en un líquido tal como agua para refrigeración. En algunas realizaciones de la presente invención, los utensilios de fermentación pueden configurarse en serie para minimizar el uso de energía. Por ejemplo, el efluente de refrigeración y el escape de dispersión de una serie de fermentadores podría usarse como suministro (o suministro parcial) de agua de refrigeración y gas, respectivamente, para fermentadores que están al lado en línea en la serie o posteriores en la serie. El sistema de fermentación puede configurarse de modo que el agua de refrigeración pudiera provenir de una masa natural de agua tal como un lago, estanque u océano. El sistema de fermentación puede diseñarse de modo que los sistemas de refrigeración para los fermentadores estén conectados en serie de modo que el efluente de agua de refrigeración de un primer fermentador o un conjunto de fermentadores que están en la serie pueda usarse como suministro de agua de refrigeración para un segundo

5 fermentador o conjunto de fermentadores en la serie. Asimismo, el sistema de fermentación puede diseñarse de modo que el suministro de gas para los fermentadores esté conectado en serie de modo que el escape de dispersión de un primer fermentador o un conjunto de fermentadores que están en la serie puede usarse como suministro de gas para un segundo fermentador o conjunto de fermentadores en la serie. El primer fermentador o conjunto de fermentadores puede estar antes o después en la serie en relación con el segundo fermentador o conjunto de fermentadores. Las fermentaciones de la presente invención se realizan preferiblemente en modo discontinuo, semidiscontinuo, semicontinuo o continuo.

10 Aunque en algunas realizaciones de la invención los aceites biológicos producidos que comprenden triglicéridos pueden ser un aceite crudo (analizado en más detalle a continuación), pueden recuperarse otros de dichos aceites útiles en la presente invención de sus fuentes por cualquier medio adecuado conocido para los expertos en la materia. Por ejemplo, puede recuperarse aceites por extracción con disolventes tales como cloroformo, hexano, cloruro de metileno, metanol y similares, por extracción de fluido supercrítico o por métodos de extracción sin disolvente. En algunas realizaciones de la presente invención los aceites biológicos se recuperan por extracción con hexano. Como alternativa, los aceites pueden extraerse usando técnicas de extracción, tales como las descritas en la patente Estados Unidos n.º 6.750.048 y la solicitud de patente PCT n.º de serie US 01/01806 (WO 01/53512), ambos presentados el 19 de enero de 2001 y titulados "Solventless Extraction Process". Se muestran técnicas adicionales de extracción y/o purificación en la solicitud de patente PCT n.º PCT/IB01/00841 (WO 01/076715) titulada "Method for the Fractionation of Oil and Polar Lipid-Containing Native Raw Materials" presentada el 12 de abril de 2001; la solicitud de patente PCT n.º de serie PCT/IB01/00963 (WO 01/076385) titulada "Method for the Fractionation of Oil and Polar Lipid-Containing Native Raw Materials Using Water-Soluble Organic Solvent and centrifugation" presentada el 12 de abril de 2001; la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/291.484 (WO 02/092540) titulada "Production and Use of a Polar Lipid-Rich Fraction Containing Stearidonic Acid and Gamma Linolenic Acid from Plant Seeds and Microbes" presentada el 14 de mayo de 2001; la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/290.899 titulada "Production and Use of a Polar-Lipid Fraction Containing Omega-3 and/or Omega-6 Highly Unsaturated Fatty Acids from Microbes, Genetically Modified Plant Seeds and Marine Organisms" presentado el 14 de mayo de 2001; la patente de Estados Unidos n.º 6.399.803 titulada "Process for Separating a Triglyceride Comprising a Docosahexaenoic Acid Residue from a Mixture of Triglycerides" expedida el 4 de junio de 2002, presentada el 17 de febrero de 2000; y la solicitud de patente PCT n.º de serie US 01/01010 (WO 01/051598) titulada "Process for Making an Enriched Mixture of Polyunsaturated Fatty Acid Esters" presentada el 11 de enero de 2001. Los aceites extraídos pueden evaporarse a presión reducida para producir una muestra de material oleoso concentrado. Los procesos para el tratamiento enzimático de la biomasa para la recuperación de lípidos se divulgan en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/377.500 (WO 03/092628) titulada "HIGH-QUALITY LIPIDS AND METHODS FOR PRODUCING BY ENZYMATIC LIBERATION FROM BIOMASS," presentada el 3 de mayo de 2002; la solicitud de patente PCT n.º de serie PCT/US03/14177 (WO 03/092628) titulada "HIGH QUALITY LIPIDS AND METHODS FOR PRODUCING BY ENZYMATIC LIBERATION FROM BIOMASS", presentada el 5 de mayo de 2003; la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente n.º 10/971.723 (US 2005/0170479) titulada "HIGH-QUALITY LIPIDS AND METHODS FOR PRODUCING BY LIBERATION FROM BIOMASS," presentada el 22 de octubre de 2004; la solicitud de patente EP 0776356 y la patente de Estados Unidos n.º 5.928.696, ambas tituladas "Process for extracting native products which are not water-soluble from native substance mixtures by centrifugal force". Los aceites pueden extraerse por prensado.

45 En algunas realizaciones, un aceite obtenido de una fuente descrita anteriormente puede servir como material de partida para modificaciones adicionales (tales como transesterificación o craqueo) de acuerdo con los métodos de la presente invención incluso cuando no se ha sometido a procesamiento convencional. Los ejemplos de dichos procesos convencionales que pueden evitarse incluyen refinado (por ejemplo, refinado físico, refinado en sílice o refinado cáustico), desolvatación, desodorización, enfriado a bajas temperaturas, filtración en frío y/o blanqueamiento. Por tanto, en determinadas realizaciones, los aceites que contienen triglicéridos no se han sometido a uno o más tratamientos seleccionados de refinado, desolvatación, desodorización, enfriado a bajas temperaturas, filtración en frío y blanqueamiento y en realizaciones adicionales, los aceites no se han sometido a uno cualquiera de refinado, desolvatación, desodorización, enfriado a bajas temperaturas, filtración en frío y blanqueamiento.

55 En algunas realizaciones, el aceite crudo puede aislarse de un microorganismo usando técnicas convencionales, sin someterse a refinado o purificación adicional. Por ejemplo, el aceite puede ser un aceite microbiano que no se ha sometido a extracción con disolvente, tal como extracción con hexano, extracción con isopropanol o similares. En algunas realizaciones de la presente invención, el aceite crudo puede aislarse de un microorganismo usando métodos físicos y/o mecánicos de extracción (tal como a través del uso de un homogeneizador o por prensado), sin someterse a refinado o purificación adicional.

60 En otras realizaciones, las composiciones que comprenden triglicéridos que tienen restos de ácido graso poliinsaturado, tales como aceites descritos anteriormente, pueden someterse a etapas adicionales de procesamiento, tales como refinado, desolvatación, desodorización, enfriado a bajas temperaturas, filtración en frío y/o blanqueamiento. Dichos aceites "procesados" incluyen aceites microbianos que se han sometido a extracción con disolvente y uno o más de estas etapas adicionales de procesamiento. En algunas realizaciones, los aceites se

procesan lo mínimo. Aceites "procesados lo mínimo" incluyen aceites microbianos que se han sometido a extracción con disolvente y filtración. En determinadas realizaciones, los aceites procesados lo mínimo se someten además a enfriado a bajas temperaturas.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, se usa un método similar al proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator Industry GmbH, Alemania) para extraer los aceites biológicos producidos por los microorganismos. FRIOLEX® es un proceso de extracción física de aceite basado en agua, por el que la materia prima que contiene aceite puede usarse directamente para extraer aceite sin usar ningún método convencional de extracción con disolvente. En este proceso, puede usarse un disolvente orgánico hidrosoluble como un auxiliar del proceso y el
10 aceite se separa del caldo de materia prima por separación por densidad usando gravedad o fuerzas centrífugas. Las publicaciones de solitud de patente n.º WO 01/76715 y WO 01/76385 divulgan dichos métodos de extracción.

Después de haber extraído el aceite, el aceite puede recuperarse o separarse de los componentes no lipídicos por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. En realizaciones preferidas de la presente invención, se usan técnicas físicas y/o mecánicas de bajo coste para separar las composiciones que contienen lípidos de las composiciones no lipídicas. Por ejemplo, si se crean múltiples fases o fracciones por el método de extracción usado para extraer el aceite, donde una o más fases o fracciones contienen lípidos, un método para recuperar las fases o fracciones que contienen lípidos puede implicar la eliminación física de las fases o fracciones que contienen lípidos de las fases o fracciones no lipídicas, o viceversa. En algunas realizaciones de la presente invención, se usa un método de tipo FRIOLEX® para extraer los lípidos producidos por los microorganismos y la fase ligera rica en lípidos entonces se separa físicamente de la fase pesada rica en proteínas (tal como por eliminación por espumado de la fase rica en lípidos que está en la parte superior de la fase pesada rica en proteínas después de la separación por densidad).

25 Los aceites biológicos producidos por los microorganismos en el método de la presente invención pueden recuperarse de autólisis o lisis inducida de los microorganismos exponiendo los microorganismos a una condición que incluye, aunque sin limitación, un determinado pH, una determinada temperatura, la presencia de una enzima, la presencia de un detergente, alteraciones físicas o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones de la presente invención se expone un microorganismo a dichas condiciones que promueven la autólisis o lisis inducida después de producir aceite en una cantidad de aproximadamente un 30 %, a aproximadamente un 90 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 90 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 90 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 90 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca, de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 85 % en peso de su biomasa seca o de aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 80 % en peso de su biomasa seca. En realizaciones adicionales de la presente invención, se expone un microorganismo a dichas condiciones que promueven autólisis o lisis inducida después de producir aceite en una cantidad de al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 % o al menos aproximadamente un 75 % en peso de su biomasa seca. En algunas realizaciones de la presente invención, se realiza lisis o autólisis de los microorganismos por el uso de fuerzas mecánicas. En realizaciones adicionales de la presente invención, la lisis o autólisis de los microorganismos va seguida por separación mecánica de los lípidos de las composiciones no lipídicas.

45 Las enzimas adecuadas que pueden usarse para inducir la lisis de los microorganismos que producen aceite incluyen, aunque sin limitación, enzimas disponibles en el mercado o mezclas de enzimas tales como proteinasa K o alcalasa. La modificación genética de un microorganismo para introducir actividades de una enzima que induce lisis de otro microorganismo o que induce autólisis se contempla dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones de la presente invención, los microorganismos que producen aceite experimentan lisis inducida en presencia de un detergente tal como detergentes iónicos (catiónicos o aniónicos), detergentes no iónicos, detergentes zwitteriónicos o combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales de la presente invención, los métodos de alteración física tales como molienda mecánica, homogeneización líquida, uso de ondas de sonido de alta frecuencia en sonicación, métodos de ciclos de congelación/descongelación, prensado, extrusión o molienda pueden usarse para inducir lisis de los microorganismos que producen aceite. Preferiblemente, la extracción de los aceites tendrá lugar en los fermentadores al final de la fermentación por lisis en el tanque de los microorganismos que producen aceite.

Una vez producidos los aceites biológicos de acuerdo con la presente invención, pueden usarse diversos métodos conocidos en la técnica para transformar los aceites biológicos en ésteres de ácidos grasos para su uso como biodiésel, biocombustible de aviones o como ingredientes para productos alimenticios o farmacéuticos. En algunas realizaciones de la presente invención la producción de ésteres de ácidos grasos comprende transesterificar los aceites biológicos producidos por el microorganismo. En algunas realizaciones de la presente invención, la extracción del aceite de los microorganismos y la transesterificación del aceite pueden realizarse simultáneamente, en un método de una etapa. Por ejemplo, el cultivo que contiene los microorganismos que producen aceite puede exponerse a condiciones o tratamientos (o una combinación de condiciones o tratamientos) que promueven tanto la extracción del aceite como la transesterificación del aceite. Dichas condiciones o tratamientos podrían incluir, aunque sin limitación, pH, temperatura, presión, la presencia de disolvente, la presencia de agua, la presencia de

5 catalizadores o enzimas, la presencia de detergentes y fuerzas físicas/mecánicas. Podrían combinarse dos conjuntos de condiciones o tratamientos para producir un método de una etapa de extracción y transesterificación del aceite, donde un conjunto de condiciones o tratamientos promueve de forma favorable la extracción del aceite y el otro conjunto de condiciones o tratamientos promueve de forma favorable la transesterificación del aceite, siempre que los dos conjuntos de condiciones o tratamientos puedan combinarse sin causar reducción significativa en la eficacia de la extracción o la transesterificación del aceite. En algunas realizaciones de la presente invención, puede realizarse hidrólisis y transesterificación directamente de la biomasa de células completas. En otras realizaciones de la presente invención, la extracción del aceite se realiza como una etapa que es diferente de la etapa de transesterificación del aceite.

10 Preferiblemente, dichas reacciones de transesterificación se realizan usando catalizadores ácidos o básicos. En algunas realizaciones de la presente invención, los métodos para transesterificar los aceites biológicos en ésteres de ácidos grasos para su uso como biodiésel o como ingredientes para productos alimenticios o farmacéuticos implican hacer reaccionar los aceites biológicos que contienen triglicéridos en presencia de un alcohol y una base para producir ésteres de los restos de ácido graso de los triglicéridos.

15 Los alcoholes adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier alcohol de alquilo inferior que contenga de 1 a 6 átomos de carbono (es decir, alcohol de alquilo C_{1-6} , tal como los alcoholes metílico, etílico, isopropílico, butílico, pentílico, hexílico e isómeros de los mismos). Sin limitarse a teoría alguna se cree que en algunas realizaciones de la presente invención el uso de alcoholes de alquilo inferior en los métodos de la presente invención produce ésteres de alquilo inferior de los restos de ácido graso. Por ejemplo, el uso de etanol produce ésteres etílicos. En determinadas realizaciones, el alcohol es metanol o etanol. En estas realizaciones, los ésteres de ácido graso producidos son un éster metílico y un éster etílico del resto de ácido graso, respectivamente. En procesos de la presente invención, el alcohol típicamente comprende de aproximadamente un 5 % en peso a aproximadamente un 70 % en peso, de aproximadamente un 5 % en peso a aproximadamente un 60 % en peso, de aproximadamente un 5 % en peso a aproximadamente un 50 % en peso, de aproximadamente un 7 % en peso a aproximadamente un 40 % en peso, de aproximadamente un 9 % en peso a aproximadamente un 30 % en peso o de aproximadamente un 10 % en peso a aproximadamente un 25 % en peso de la mezcla de la composición de aceite, el alcohol y la base. En determinadas realizaciones, la composición y la base pueden añadirse a etanol puro o metanol puro. En general la cantidad de alcohol usada puede variar con la solubilidad del aceite o la composición que contiene triglicéridos en el alcohol.

20 Puede usarse cualquier base conocida en la técnica que sea adecuada para su uso como reactivo en la presente invención. Las bases de la fórmula RO-M, donde M es un catión monovalente y RO es un alcóxido de un alcohol de alquilo C_{1-6} son particularmente adecuadas para la presente invención. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen sodio elemental, metóxido de sodio, etóxido de sodio, metóxido de potasio y etóxido de potasio. En algunas realizaciones, la base es etóxido de sodio. En procesos de la presente invención, la base se añade típicamente en una cantidad de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,0 equivalentes molares de triglicéridos, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,5 equivalentes molares de triglicéridos, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,4 equivalentes molares de triglicéridos, de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1,3. equivalentes molares de triglicéridos o de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1,2 equivalentes molares de triglicéridos a la etapa de reacción con la composición y el alcohol.

25 La composición que comprende triglicéridos, el alcohol y la base se hacen reaccionar juntos a una temperatura y durante una cantidad de tiempo que permite la producción de un éster a partir de los restos de ácido graso y el alcohol. Los tiempos de reacción y temperaturas adecuados pueden determinarse por un experto en la materia para producir un éster. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que los restos de ácido graso se escinden de la estructura de glicerol del triglicérido y los ésteres de cada resto de ácido graso se forman durante la etapa de reacción. En determinadas realizaciones, la etapa de reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 140 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 120 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 110 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 100 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 90 °C. En realizaciones adicionales, la etapa de reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza a una temperatura de al menos aproximadamente 20 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C, 105 °C o 120 °C. En algunas realizaciones de la presente invención, la etapa de reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza a una temperatura de aproximadamente 20 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C, 105 °C o 120 °C. En algunas realizaciones, la etapa de reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza durante un tiempo de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 36 horas, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 36 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 36 horas, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 36 horas o de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 36 horas. En determinadas realizaciones, la etapa de reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza durante aproximadamente 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32 o 36 horas.

30 En una realización, la etapa de reacción de la composición de aceite, alcohol y base puede realizarse llevando a reflujos los componentes para producir los ésteres de ácido graso, tal como ésteres de PUFA. En realizaciones adicionales, la etapa de reacción de la composición de aceite puede realizarse a una temperatura que no provoca el

- reflujo de los componentes de reacción. Por ejemplo, realizar la etapa de reacción de la composición de aceite a presiones mayores de la presión atmosférica puede aumentar el punto de ebullición de los disolventes presentes en la mezcla de reacción. En dichas condiciones, la reacción puede producirse a una temperatura en que los disolventes hervirían a presión atmosférica, pero no provocaría el reflujo de los componentes de reacción. En algunas realizaciones, la reacción se realiza a una presión de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 libras por pulgada cuadrada, psi (aproximadamente 6895 a aproximadamente 137 895 Pa); de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 psi (aproximadamente 48 263 a aproximadamente 103 421 Pa); o de aproximadamente 9 a aproximadamente 12 psi (aproximadamente 62 052 a aproximadamente 82 737 Pa). En determinadas realizaciones, la reacción se realiza a una presión de 7, 8, 9, 10, 11 o 12 psi (42 263, 55 158, 62 052, 68 947, 75 842 o 82 737 Pa).
- Las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a las temperaturas de reacción enumeradas anteriormente. En algunas realizaciones, las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a al menos aproximadamente 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C o 90 °C. En algunas realizaciones, las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C o 90 °C.
- La mezcla de reacción que comprende ésteres de ácido graso puede procesarse adicionalmente para obtener los ésteres de ácido graso de la mezcla. Por ejemplo, la mezcla puede enfriarse, diluirse con agua y la solución acuosa extraerse con un disolvente tal como hexano para producir una composición que comprende ésteres de ácido graso. Las técnicas para lavar y/o extraer mezclas de reacción en bruto son conocidas en la técnica.
- En algunas realizaciones de la presente invención, se usan microorganismos que producen bajos niveles de PUFA para producir los aceites biológicos, especialmente para su uso en producción biodiésel. Este método podría reducir los costes de producción de biodiésel.
- Los ésteres de PUFA más valiosos pueden recuperarse por destilación para producir ésteres de PUFA de alta potencia que después pueden venderse para reducir el coste global de la producción del producto de biodiésel.
- Los ejemplos y sistemas de producción de lípidos modificados se divulgan en las publicaciones de solicitud de patente n.º WO 06/031699, US 2006/0053515, US 2006/0107348 y WO 06/039449.
- En una realización de la presente invención, los ésteres de ácido graso se separan de la mezcla de reacción destilando la composición para recuperar una fracción que comprende el éster del ácido graso. De esta manera, una fracción diana de la mezcla de reacción que incluye los ésteres de ácido graso de interés puede separarse de la mezcla de reacción y recuperarse.
- En determinadas realizaciones, la destilación se realiza al vacío. Sin limitarse a teoría alguna, la destilación al vacío permite que la destilación se consiga a una temperatura inferior que en ausencia de un vacío y, por tanto, puede evitar la degradación de los ésteres. Las temperaturas típicas de destilación varían de aproximadamente 120 °C a aproximadamente 170 °C. En algunas realizaciones, la etapa de destilación se realiza a una temperatura de menos de aproximadamente 180 °C, menos de aproximadamente 175 °C, menos de aproximadamente 170 °C, menos de aproximadamente 165 °C, menos de aproximadamente 160 °C, menos de aproximadamente 155 °C, menos de aproximadamente 150 °C, menos de aproximadamente 145 °C, menos de aproximadamente 140 °C, menos de aproximadamente 135 °C o menos de aproximadamente 130 °C. Las presiones típicas para destilación al vacío varían de aproximadamente 0,1 mm de Hg a aproximadamente 10 mm de Hg (aproximadamente 13,3 a aproximadamente 133 Pa). En algunas realizaciones, la presión para la destilación al vacío es de al menos aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 mm de Hg (13,3, 66,66, 133,33, 199,98, 266,65, 333,30, 399,96, 466,63 o 533,29 Pa). En algunas realizaciones de la presente invención, la presión para la destilación al vacío es de aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 mm de Hg (13,3, 66,66, 133,33, 199,98, 266,65, 333,30, 399,96, 466,63 o 533,29 Pa).
- En algunas realizaciones de la presente invención los ésteres de ácidos grasos producidos a través de transesterificación de los aceites biológicos se aíslan adicionalmente a través de aducción de urea. La urea puede disolverse en un medio que comprende los ésteres de ácido graso para formar un medio que comprende ésteres de ácido graso y urea disuelta. Este medio entonces se enfría o concentra para formar un precipitado que comprende urea y al menos una parte de los ésteres de ácido graso saturados y una fracción líquida que comprende al menos la mayoría de los ésteres de ácido graso poliinsaturados. El precipitado y la fracción líquida entonces puede separarse para aislar los ésteres de ácido graso saturados o poliinsaturados. En algunas realizaciones de la presente invención, el medio que comprende los ésteres de ácido graso y la urea disuelta se enfría hasta una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente -50 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente -40 °C o de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -30 °C. La patente de Estados Unidos n.º 6.395.778 divulga métodos de transesterificación seguida por aducción de urea.
- Además de los métodos de transesterificación descritos anteriormente, también pueden incorporarse otras técnicas de reducción de la viscosidad de los aceites biológicos producidos usando la presente invención en los métodos de la invención para producir biocombustibles basados en lípidos. Estas técnicas incluyen, aunque sin limitación, el uso de lipasas, catálisis de metanol supercrítico y el uso de sistemas de células completas que implican sobreexpresión citoplasmática de lipasas en una célula hospedadora seguida por permeabilización del hospedador para permitir la

catálisis de transesterificación de los triglicéridos dentro del citoplasma. Las publicaciones de patente o de solicitud de patente n.º US 7226771, US 2004/0005604, WO 03/089620, WO 05/086900, US 2005/0108789, WO 05/032496, WO 05/108533, US 6982155, WO 06/009676, WO 06/133698, WO 06/037334, WO 07/076163, WO 07/056786 y WO 06/124818 divulgan ejemplos de procesos para convertir lípidos en biodiésel.

Los traustocóquitos en general y *Schizochytrium* en particular son similares a muchas microalgas y protistas marinos y de estuarinos en que acumulan una determinada cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en sus lípidos celulares. Los bajos niveles de PUFA pueden ser útiles ya que deben reducir el punto de gelificación del combustible haciéndolo más adecuado para climas fríos. Las preocupaciones potenciales de los consumidores acerca de los olores generados por la quema de biodiésel que contiene PUFA en motores ineficaces (que pasan combustible parcialmente oxidado al escape) pueden compensarse un poco por el hecho de que el combustible biodiésel de microalgas puede mezclarse con gasóleo fósil a relaciones de un 1-99 % para minimizar este problema. Para asegurar que pudiera quemarse un 100 % del biodiésel derivado de aceite de microalgas sin cuestiones significativas para el usuario, podría usarse hidrogenación parcial o total del aceite como es rutinario en la fabricación de margarinas. En algunas realizaciones de la presente invención, puede usarse la tecnología de craqueo (tales como métodos de craqueo conocidos en la industria del petróleo) para reducir la longitud de la cadena del ácido graso. Una vez se ha producido el aceite biológico de acuerdo con métodos de la presente invención, puede realizarse el craqueo del aceite biológico para producir el biocombustible basado en lípidos deseado. Para determinados biocombustibles basados en lípidos donde se requiere una diversidad de hidrocarburos más cortos, tal como para biocombustibles de avión, pueden ser útiles altos niveles de PUFA de modo que pueda producirse la escisión de PUFA en múltiples sitios para producir los diversos hidrocarburos.

Las composiciones de biocombustible basado en lípidos producidas por el método de la presente invención se producen a bajos costes y son sustitutos eficaces para petrodiesel o combustible de aviones. En algunas realizaciones de la presente invención la composición de biocombustible basado en lípidos comprende de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 75 % en peso de ésteres alquílicos de PUFA de cadena larga que tienen 20 a más carbonos. En realizaciones adicionales de la presente invención, la composición de biodiésel producida comprende de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 50 %, de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 25 % o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 % en peso de ésteres alquílicos de PUFA de cadena larga que tienen 20 a más carbonos.

En algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones de biocombustible basado en lípidos (100 % biocombustible basado en lípidos, no mezclado con petrodiesel o combustible de aviones) tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 30 °C a aproximadamente -60 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente -50 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente -50 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente -30 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente -20 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente -10 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente -10 °C o de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -10 °C. En realizaciones adicionales de la presente invención, las composiciones de biodiésel liberan de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 megajulios por litro, de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 megajulios por litro o de aproximadamente 38 a aproximadamente 40 megajulios por litro. Se divulgan diversas formas de biodiésel, por ejemplo, en las publicaciones de patente o solicitud de patente n.º WO 07/061903, US 7172635, EP 1227143, WO 02/38709, WO 02/38707 y US 2007/0113467.

La presente invención puede usar una instalación de fabricación de biocombustible basado en lípidos que se puede cambiar de escala que puede estar ubicada con una instalación de producción de etanol (tal como una instalación de etanol celulósico). Los ejemplos de sistemas de algas relacionados con la producción de combustibles que no están basados en lípidos (tales como etanol) se divulgan en las publicaciones de patente o de solicitud de patente n.º US 7135308 y WO 02105932.

En algunas realizaciones de la presente invención, el tratamiento de la materia básica sería similar o idéntico tanto para fermentaciones de etanol celulósico como para fermentaciones de biocombustibles basados en lípidos celulósicos. Por ejemplo, después de una fermentación de biodiésel celulósico, puede extraerse el aceite y transesterificarse (simultánea o secuencialmente) para fabricar biodiésel. El alcohol usado en la transesterificación podría provenir de un proceso de producción de etanol (tal como un proceso de producción de etanol celulósico) y el glicerol sobrante de la transesterificación del biodiésel podría usarse como fuente de carbono complementaria para el proceso de fermentación de etanol (o para el propio proceso de biodiésel, ya que los organismos tales como *Schizochytrium* metabolizan fácilmente el glicerol). En realizaciones preferidas de la presente invención, los microorganismos usados en la invención pueden usar glicerol como fuente de carbono. Los residuos nitrogenados (tales como biomasa de levaduras) también pueden servir como fuentes de nitrógeno en fermentaciones de biodiésel (la mayoría de los traustocóquitos pueden utilizar extracto de levadura como fuente de nitrógeno). Los residuos tales como biomasa de microorganismos deslipidados pueden reciclarse para su uso en una posterior fermentación, quemarse para producir calor o electricidad o usarse como fertilizante para el cultivo que proporciona la materia básica celulósica. El biodiésel o los gases residuales resultantes pueden usarse para aprovisionar de combustible las instalaciones de producción de biodiésel o etanol, haciéndolas energéticamente independientes. Adicionalmente, las bombas de la instalación podrían estar accionadas por el aire de escape recuperado.

En algunas realizaciones de la presente invención, el método de producción de biocombustibles basados en lípidos comprende cultivar un microorganismo usando nutrientes que comprenden medios reciclados para producir un aceite biológico. Los medios reciclados incluyen, aunque sin limitación, biomasa de deslipidada, biomasa hidrolizada, biomasa parcialmente hidrolizada, metales, sales, aminoácidos, carbohidratos extracelulares, glicerol, biomasa de levadura reciclada o combinaciones de los mismos, todos los cuales se reciclaron de un procesamiento de fermentación previo u otro proceso. Por ejemplo, la biomasa de levadura residual y el residuo de biomasa deslipidada de *Stramenopile* hidrolizada puede reciclarse en el pretratamiento con vapor, explosión de fibras con amoníaco, etapa de separación o en la hidrólisis enzimática, la etapa de separación y evaporación como se muestra en la figura 1. La biomasa parcialmente hidrolizada puede reciclarse de nuevo junto con los medios en estas etapas para hidrólisis adicional. El uso de medios reciclados puede emplearse para la producción de aceites biológicos con alto o bajo contenido de ácidos grasos poliinsaturados, dependiendo de las necesidades de una aplicación específica.

La tecnología basada en celulosa (carbono de bajo coste) puede usarse en la presente invención para reducir el coste de producción de cualquier compuesto que pueda producirse por fermentación de levaduras o microorganismos del reino *Stramenopile* (tales como traustóquítridos), incluyendo microorganismos modificados genéticamente. Los ejemplos de compuestos que pueden producirse usando los métodos de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, PUFA, ésteres de PUFA, proteínas (incluyendo enzimas y proteínas terapéuticas), oxilipinas, carotenoides y lípidos.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden usarse para producir composiciones que contienen un alto porcentaje de PUFA o ésteres de PUFA. Por ejemplo, dichas composiciones pueden contener de aproximadamente un 50 % en peso a aproximadamente un 100 % en peso de un PUFA o un éster de un PUFA, y en otras realizaciones, la composición puede comprender al menos aproximadamente un 50 % en peso, al menos aproximadamente un 55 % en peso, al menos aproximadamente un 60 % en peso, al menos aproximadamente un 65 % en peso, al menos aproximadamente un 70 % en peso, al menos aproximadamente un 75 % en peso, al menos aproximadamente un 80 % en peso, al menos aproximadamente un 85 % en peso, al menos aproximadamente un 90 % en peso, al menos aproximadamente un 95 % en peso, al menos aproximadamente un 99 % en peso de PUFA o ésteres de PUFA.

Las composiciones que comprenden PUFA o ésteres de PUFA producidas por la presente invención pueden usarse en productos farmacéuticos. En algunas realizaciones, los productos farmacéuticos pueden contener PUFA o ésteres de PUFA sin un agente farmacéuticamente activo adicional. En otras realizaciones, el producto farmacéutico puede comprender un agente farmacéuticamente activo. Los ejemplos de agentes farmacéuticamente activos incluyen estatinas, agentes antihipertensivos, agentes antidiabéticos, agentes antienajenación, antidepresivos, agentes antiobesidad, supresores del apetito y agentes para potenciar la memoria y/o la función cognitiva. Los productos farmacéuticos pueden comprender además cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículos, aglutinantes u otros componentes de formulación conocidos en la técnica.

Los PUFA o ésteres de PUFA producidos por los métodos de la presente invención son adecuados para su uso como agentes terapéuticos y experimentales. La presente invención puede usarse para producir PUFA o ésteres de PUFA útiles para el tratamiento de lactantes con deficiencia de PUFA. Los PUFA o ésteres de PUFA pueden incluirse en una formulación parenteral que puede administrarse a un lactante a través de vía parenteral para reforzar el suministro del lactante de un PUFA. Las vías parenterales preferidas incluyen, aunque sin limitación, vía subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal. Una formulación parenteral puede incluir PUFA o ésteres de PUFA de la presente invención y un vehículo adecuado para suministro parenteral. Como se usa en este documento, un "vehículo" se refiere a cualquier sustancia adecuada como vehículo para suministrar una molécula o composición a un sitio *in vivo* adecuado de acción. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen, aunque sin limitación, agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa, soluciones que contienen suero, solución de Hank y otras soluciones fisiológicamente equilibradas acuosas. Los vehículos adecuados también incluyen vehículos basados en aceite, soluciones no acuosas, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo, aceite de ricino polietoxilado (cremaphor) y otros conocidos en la técnica. Los protocolos aceptables para administrar PUFA o ésteres de PUFA de una manera eficaz incluyen el tamaño de dosis individual, el número de dosis, la frecuencia de administración de dosis y el modo de administración. La determinación de dichos protocolos puede conseguirse por los expertos en la materia dependiendo de una diversidad de variables, incluyendo el peso del lactante y el grado de deficiencia de PUFA. La presente invención también puede usarse para producir PUFA o ésteres PUFA útiles para el tratamiento de adultos, en particular madres embarazadas. Los protocolos aceptables para la administración de PUFA o ésteres de PUFA a adultos incluyen técnicas de alimentación parenteral o encapsulación de PUFA o ésteres de PUFA en una cápsula, tal como cápsula de gelatina (es decir, digerible), para administración oral y/o en una formulación de dieta líquida. Una formulación de dieta líquida puede comprender una composición líquida que contiene nutrientes adecuados para complementar una dieta o nutrientes suficientes como una dieta completa.

Los PUFA o ésteres de PUFA producidos por los métodos de la presente invención también pueden usarse para tratar a sujetos (por ejemplo, seres humanos o animales) con altos niveles de triglicéridos, incluyendo sujetos con

trigliceridemia. Por ejemplo, los sujetos con niveles de triglicéridos en o por encima de 500 mg/dl pueden beneficiarse del tratamiento con los PUFA o ésteres de PUFA de la presente invención. Los PUFA o ésteres de PUFA individuales pueden administrarse a un sujeto para tratar altos niveles de triglicéridos. El PUFA o éster de PUFA puede ser DHA o ARA. Las combinaciones de PUFA o ésteres de PUFA pueden administrarse a un sujeto para tratar altos niveles de triglicéridos. La combinación de PUFA o ésteres de PUFA puede comprender PUFA omega-3 y omega-6 tales como DHA y DPA n-6. Los PUFA o ésteres de PUFA pueden comprender aproximadamente un 90 % de una composición administrada al sujeto. Los PUFA o ésteres de PUFA pueden administrarse con otros componentes y excipientes, tales como los vehículos descritos anteriormente. Los PUFA o ésteres de PUFA también pueden usarse para tratar a sujetos con enfermedades que pueden estar asociadas con altos niveles de triglicéridos, tales como enfermedad cardiovascular o hipertensión.

Los ésteres de PUFA producidos por los métodos de la presente invención pueden usarse para producir sales de PUFA. En algunas realizaciones, las sales de PUFA pueden producirse haciendo reaccionar los ésteres de PUFA de la presente invención en presencia de una base de metal alcalino tal como un hidróxido de metal alcalino (por ejemplo, hidróxido de potasio). Las sales de PUFA formadas a partir de los ésteres de PUFA de la presente invención pueden usarse en una diversidad de aplicaciones, tal como en alimentos, bebidas y agentes farmacéuticos. En algunas realizaciones, las sales de PUFA producidas usando los ésteres de PUFA de la presente invención son hidrosolubles y pueden usarse directamente en alimentos, bebidas y agentes farmacéuticos.

Los PUFA o ésteres de PUFA producidos por los métodos de la presente invención pueden usarse en cualquier material de alimentación animal, particularmente materiales alimenticios para seres humanos, para crear un producto alimenticio que tenga concentraciones potenciadas de PUFA. La cantidad de ácidos grasos de forma natural en los productos alimenticios varía de un producto alimenticio a otro. Un producto alimenticio producido usando la presente invención puede tener una cantidad normal de un PUFA o una cantidad modificada de un PUFA. En el primer caso, puede sustituirse una parte de los lípidos de origen natural por PUFA o ésteres de PUFA producidos por el método de la presente invención. En el último caso, los lípidos de origen natural pueden complementarse por PUFA o ésteres de PUFA producidos por el método de la presente invención.

Los PUFA o ésteres de PUFA pueden añadirse a alimentos para lactantes tales como fórmulas infantiles y alimentos para bebés. De acuerdo con la presente invención, un lactante se refiere a lactantes y niños de menos de aproximadamente dos años de edad incluyendo, en particular, lactantes prematuros. Determinados PUFA son componentes particularmente importantes de fórmulas infantiles y alimentos para bebés a causa del rápido crecimiento de los lactantes (es decir, que duplican o triplican el peso durante el primer año de vida). Una cantidad eficaz de PUFA o éster de PUFA para complementar las fórmulas infantiles es una cantidad que se aproxima a la concentración de los PUFA en leche materna humana. Las cantidades preferidas de PUFA o ésteres de PUFA a añadir a las fórmulas infantiles o alimentos para bebés varían de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 1,0 % de ácidos grasos totales, más preferiblemente de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 0,6 % de ácidos grasos totales e incluso más preferiblemente de aproximadamente un 0,4 % de ácidos grasos totales.

La presente invención puede usarse para producir un producto alimenticio que comprende un material alimenticio combinado con PUFA o ésteres de PUFA. Los PUFA o ésteres de PUFA pueden añadirse a un material alimenticio para crear un producto alimenticio que tenga concentraciones potenciadas de PUFA. Como se usa en este documento, la expresión "material alimenticio" se refiere a cualquier tipo de alimento suministrado a seres humanos o animales no humanos. También dentro del alcance de la presente invención hay un método para fabricar un producto alimenticio que comprende un método reivindicado y añadir además PUFA o ésteres de PUFA producidos por métodos de la presente invención a un material alimenticio.

Un material alimenticio adecuado útil para la formación de un producto alimenticio producido usando la presente invención incluye alimento para animales. El término "animal" significa cualquier organismo que pertenezca al reino Animalia e incluye, sin limitación primates (por ejemplo, seres humanos y monos), ganado y mascotas domésticas. La expresión "producto alimenticio" incluye cualquier producto a suministrar a dichos animales. Los materiales alimenticios preferidos para consumir por seres humanos incluyen, fórmulas infantiles y alimentos para bebés. Los materiales alimenticios preferidos para consumir por mascotas domésticas incluyen alimentos para perros.

Los PUFA o ésteres de PUFA producidos por métodos de la presente invención pueden añadirse a una amplia gama de productos tales como productos cocinados, suplementos vitamínicos, suplementos de la dieta, bebidas energéticas, etc. En diversas fases de producción. Pueden producirse numerosos productos alimenticios en polvo acabados o semiacabados usando las composiciones de la presente invención.

Una lista parcial de productos alimenticios que comprenden los productos que pueden producirse usando la presente invención incluyen masas, rebozados, artículos alimenticios cocinados que incluyen, por ejemplo, artículos tales como tartas, tartas de queso, pasteles, magdalenas, galletas, barras, panes, rosquillas, bizcochos, molletes, pastas, bollos y picatostes; productos alimenticios líquidos, por ejemplo, bebidas, bebidas energéticas, fórmulas infantiles, comidas líquidas, zumos de frutas, jarabes multivitamínicos, sustitutivos de comidas, alimentos medicinales y jarabes; productos alimenticios semisólidos tales como alimentos para bebés, yogur, queso, cereal, mezclas para tortitas; barras alimenticias incluyendo barras energéticas; carnes procesadas; helados; postres

helados; yogures helados; mezclas de gofre; aderezos de ensaladas; y mezclas sustitutivas de huevo. También se incluyen productos cocinados tales como galletas, galletas saladas, productos dulces, tentempié de merienda, pasteles, barras de granola/tentempié y pasteles tostados; aperitivos salados como patatas fritas, tiras de maíz, nachos, aperitivos extruidos, palomitas de maíz, rosquetes, patatas fritas de bolsa y nueces; aperitivos específicos tale como salsas, aperitivos de frutas secas, aperitivos de carne, cortezas de cerdo, barras alimenticias saludables y tartas de arroz/maíz; y aperitivos de confitería tales como caramelos.

Otro producto que puede producirse usando la presente invención es un alimento médico. Un alimento médico incluye un alimento que está en una formulación a consumir o administrarse de forma externa bajo la supervisión de un médico y que está pretendida para el tratamiento en la dieta específico de una enfermedad o afección para la que se establecen requisitos nutritivos distintivos, basados en principios científicos reconocidos por evaluación médica.

Ejemplos

15 Ejemplo 1 (Referencia)

Usando fermentadores de 2 litros, en condiciones de fermentación típicas, se cultivarían cultivos de un *Schizochytrium* o *Thraustochytrium* de tipo silvestre usando una fuente sacarificada de celulosa. Cada fermentador se alimentaría por lotes con un medio que contiene carbono (celulosa sacarificada), nitrógeno, fósforo, sales, oligoelementos metálicos y vitaminas. Cada fermentador se inocularía con un cultivo de siembra típico, después se cultivaría durante 72-120 horas y se suministraría tanto un suministro de carbono (celulosa sacarificada) como con un suministro de nitrógeno durante el cultivo. El suministro de nitrógeno se suministraría y consumiría únicamente durante la fase de crecimiento, mientras que el carbono (celulosa sacarificada) se suministraría y consumiría durante toda la fermentación. Después de 72-120 horas, cada fermentador se recogería y se sometería a autólisis o hidrólisis. El material hidrolizado se separaría en las fracciones oleosa y de biomasa. El aceite entonces se transesterificaría y separaría del glicerol. El éster monoalquílico se lavaría en agua para producir un producto acabado. Condiciones de control de fermentación típicas:

Temperatura:	20 - 40 grados Celsius
pH:	3,0 - 10,0
Agitación	100 - 400 cps
Flujo de aire	0,25 - 3,0 vvm
Celulosa sacarificada:	5 - 35 g/l (concentración en el tanque)
Inóculo:	1 % - 50 %

30 Ejemplo 2 (Referencia)

Usando fermentadores de 10 litros, en condiciones de fermentación típicas, se cultivaría un cultivo de *Schizochytrium* o *Thraustochytrium* de tipo silvestre o transgénico en una fuente de celulosa licuada. El organismo produciría las enzimas necesarias para sacarificar la celulosa y metabolizar la glucosa, xilosa, hemicelulosa y lignina simultáneamente. Cada fermentador se alimentaría por lotes con un medio que contiene carbono (celulosa licuada), nitrógeno, fósforo, sales, oligoelementos metálicos y vitaminas. Cada fermentador se inocularía con un cultivo de siembra típico, después se cultivaría durante 72-120 horas y se suministraría tanto con un suministro de carbono (celulosa licuada) como un suministro de nitrógeno durante el cultivo. El suministro de nitrógeno se suministraría y consumiría únicamente durante la fase de crecimiento, mientras que el carbono (celulosa licuada) se suministraría y consumiría durante toda la fermentación. Después de 72-120 horas, cada fermentador se recogería y se sometería a autólisis o hidrólisis. El material hidrolizado se separaría en las fracciones oleosa y de biomasa. El aceite entonces se transesterificaría y separaría del glicerol. El éster monoalquílico se lavaría en agua para producir un producto acabado.

45 Condiciones de fermentación típicas:

Temperatura:	20 - 40 grados Celsius
pH:	3,0 - 10,0
Agitación	100 - 400 cps
Flujo de aire	0,25 - 3,0 vvm
Celulosa licuada:	5 - 35 g/l (concentración en el tanque)
Inóculo:	1 % - 50 %

Ejemplo 3 (Referencia)

50 El *Schizochytrium* o *Thraustochytrium* transgénico del ejemplo 2 se desarrollaría usando un sistema de transformación de salida (tal como el divulgado en la solicitud de patente publicada n.º WO 2002/083869 A2) para expresar genes que codifican celulasas, hemicelulasas, ligninasas, transportadores de sacárido, epimerasas e isomerasas de sacárido conocidas y apropiadas. Como alternativa, las celulasas, hemicelulasas, ligninasas, transportadores de sacárido, epimerasas e isomerasas de sacárido previamente no caracterizadas podrían aislarse

5 de bases de datos de genoma existentes o mediante estrategias de descubrimiento de genes convencionales con organismos no caracterizados o menos caracterizados, incluyendo PCR con cebadores degenerados basados en regiones conservadas de genes homólogos, o secuenciación en masa y explotación de marcas de secuencia expresadas (EST) o secuencias genómicas, u otras técnicas. La expresión génica apropiada y las actividades de producto génico se validarían usando técnicas convencionales tales como electroforesis en gel, transferencias de Northern y Western, ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA) y ensayos de conversión de sustrato.

Ejemplo 4

10 Usando fermentadores de 2 litros, en condiciones de fermentación típicas, se cultivaron dos cultivos de un *Schizochytrium* de tipo silvestre (ATCC 20888) para comparar los perfiles de ácidos grasos y las tasas de producción de lípidos en condiciones estériles y no estériles. Cada fermentador se alimentó por lotes con un medio que contenía carbono, nitrógeno, fósforo, sales, oligoelementos metálicos y vitaminas. El fermentador estéril se sometió a autoclave durante 120 minutos y todos los componentes del medio se esterilizaron en el fermentador o se añadieron como soluciones estériles después de someter a autoclave. El fermentador no estéril se alimentó por lotes con agua corriente y todos los ingredientes se añadieron al fermentador sin esterilización antes de la inoculación. Cada fermentador se inoculó con un cultivo de siembra típico, después se cultivó durante 50 horas y se suministró tanto un suministro de carbono como un suministro de nitrógeno durante el cultivo. El suministro de nitrógeno se suministró y consumió únicamente durante la fase de crecimiento, mientras que el carbono se suministró y consumió durante toda la fermentación. Después de 50 horas cada fermentador se muestreó, se centrifugó, se liofilizó se convirtió en éster metílico de ácido graso y se analizó por cromatografía de gases. Condiciones de fermentación típicas:

Temperatura: 28 - 30 grados Celsius
 pH: 5,0 - 7,5
 Agitación 100 - 300 cps
 Flujo de aire 0,25 - 2,0 vvm
 Glucosa: 5 - 35 g/l (concentración)
 Inóculo: 1 % - 30 %

25 Los resultados fueron los siguientes:

Condición	Estéril	No estéril
Cepa	ATCC 2088	ATCC 20888
Hora de registro	50	50
Muestra	BN25 8.08,14	BN26 8.08,14
% 12:0	0,21	0,12
% 13:0	0,16	0,16
% 14:0	9,73	6,14
% 15:1	0,59	0,79
% 16:0	39,93	36,26
% 16:1	0,13	0,07
% 17:0	0,17	0,28
% 18:0	1,13	1,16
% 18:1 n-9	0,13	0,08
% 18:1 n-7	0,10	0,00
% 18:3 n-6	0,10	0,12
% 18-3 n-3	0,04	0,07
% 18-4 n-3	0,12	0,13
% 20:0	0,10	0,10
% 20:3 n-6	0,27	0,33
% 20:4 ARA	0,37	0,32
% 20:5 EPA	0,45	0,56
% 22:5 n-6	12,61	14,52
% 22:6 DHA	32,67	37,43
% Grasa	40,92	35,79
% Desconocido	0,98	1,10
% Saturados	51,44	44,23
% Monoinsaturados	0,81	0,87
% Poliinsaturados	46,64	53,48

Las figuras 3 y 4 muestran gráficos de los resultados del experimento.

Ejemplo 5 (No es parte de la reivindicación 1, bajo rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados)

5 Usando un fermentador de 5 litros, en condiciones de fermentación de bajo coste, se cultivó *Schizochytrium* de tipo silvestre (ATCC 20888) para evaluar el potencial de producir biomasa de algas de forma heterotrófica usando condiciones no estériles de bajo coste. El fermentador no estéril consistía en un recipiente de acero templado, revestido con una membrana de polipropileno, un difusor de tubo, una línea de escape y una línea de adición. El fermentador no estéril se alimentó por lotes con agua corriente y un medio que contenía carbono, nitrógeno, fósforo, sales, oligoelementos metálicos y vitaminas. Los ingredientes se añadieron al fermentador sin esterilización antes de la inoculación. El fermentador se inoculó con un cultivo de 50 ml de un matraz de 250 ml. El fermentador se cultivó durante 6 días, sin añadir nada al fermentador durante el cultivo (después de la inoculación). Después de 6 días, el fermentador se muestreó, se liofilizó, se convirtió en éster metílico de ácido graso y se analizó por cromatografía de gases.

15 Condiciones de fermentación típicas:

Temperatura: 28 - 30 grados Celsius
 pH: Sin control
 Agitación Ninguna
 Flujo de aire 2,0 - 4,0 vvm
 Glucosa: 5 - 35 g/l (concentración inicial; sin suministros adicionales)
 Inóculo: 1 %

Medios discontinuos no estériles:

Ingrediente	Concentración final
Na ₂ SO ₄	8 g/l
KCl	1 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g/l
KH ₂ PO ₄	12 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 g/l
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2 g/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	51,5 mg/l
MnCl ₂ .4H ₂ O	3,1 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,1 mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,04 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,04 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,07 mg/l
NiSO ₄ .6H ₂ O	2,07 mg/l
Tiamina	9,75 mg/l
Vitamina B12	0,16 mg/l
Ca _{1/2} -pantotenato	3,33 mg/l
Glucosa	80 g/l

Los resultados fueron los siguientes:

% PUFA	5,75
% monosaturados	55,18
% saturados	37,19
g/l de aceite	4,64

20

Ejemplo 6

Podría usarse un sistema de fermentación de dos fases en la fermentación heterotrófica de un microorganismo. La primera fase (fase de siembra) abordaría la acumulación de biomasa y la segunda fase (fase de producción de lípidos) abordaría la acumulación de lípidos. Un ejemplo del sistema de fermentación se describe a continuación.

El sistema de fermentación descrito a continuación incluye un recipiente de siembra continua y múltiples recipientes de producción de lípidos que se procesan en modo semidiscontinuo. El recipiente de siembra tiene un volumen de trabajo de xx galones, un octavo de los recipientes de la fase de producción de lípidos (xxx galones) basándose en las siguientes suposiciones:

- 1) 6 horas de tiempo de duplicación celular,
- 2) 24 horas de tiempo de llenado para cada lote de la fase de producción de lípidos,
- 3) volumen inicial (después del llenado) de cada lote de producción de lípidos que es 1/12 del volumen recogido.

35

Fase de siembra continúa

Después de la inoculación inicial/crecimiento hasta alcanzar el estado estacionario, el recipiente de siembra recibirá un suministro de nutriente estéril continuo a una tasa constante (xx GPM, ~1/48 del volumen recogido por hora). Se extraerá caldo del recipiente y se transferirá a un recipiente de la fase de producción de lípidos a la misma tasa que el suministro de nutrientes. Después de que el recipiente de producción alcance el volumen de partida deseado (~1/2 del volumen recogido después de llenado de ~24 horas), el recipiente de siembra entonces se conectará al siguiente recipiente de producción de lípidos disponible.

El suministro de nutrientes incluirá una fuente de carbono (materia básica celulósica y/o azúcares simples), una fuente de nitrógeno (por ejemplo, NH₃), sales, vitaminas y oligoelementos metálicos a concentraciones para mantener el crecimiento apropiado (y posteriormente para mantener la producción de lípidos óptima). Puede usarse biomasa deslipidada reciclada y glicerol como parte de los nutrientes para reducir el coste de la materia prima. En estado estacionario, la concentración de biomasa probablemente alcanzará al menos aproximadamente 50-100 g/l.

Se suministrará flujo de aire para proporcionar suficiente oxígeno para el crecimiento celular. Los requisitos de flujo de aire podrían estar en el intervalo de ~0,5-1,0 vvm para conseguir OUR (tasa de captación de oxígeno) de ~50-150 mmoles/l/h. Se espera una generación de calor metabólico significativo para el proceso y se requerirá suficiente eliminación de calor para mantener la temperatura diana del proceso (por ejemplo, ~25-35 °C). Habitualmente se usa una relación de 0,113 kcal/mmol de captación de O₂ para estimar una generación de calor metabólico por los microorganismos y puede producirse una generación de calor estimada de ~6-17 kcal/l/h. Algo del calor puede eliminarse por el flujo de aire, pero aun se requerirá una significativa capacidad de eliminación de calor para mantener la temperatura diana. Puede requerirse control del pH por un ácido (por ejemplo, ácido sulfúrico) y/o una base (cáustica) para mantener el pH diana para el crecimiento óptimo. Debido a la naturaleza de la fase de siembra, el medio y las condiciones del proceso muy probablemente favorecerán el crecimiento de contaminantes; y por lo tanto, será muy deseable un diseño de sistema con bajo riesgo de contaminación. El proceso de dos fases puede realizarse en fermentadores no estériles a través de la selección de condiciones que sean desfavorables para los contaminantes. Otra opción es ejecutar la fase de siembra continua de forma aséptica y la fase de producción de lípidos (que puede ser limitación de nutrientes tal como limitación de nitrógeno) en condiciones no estériles.

Fase de producción de lípidos (semidiscontinua)

El recipiente de la fase de producción de lípidos se ejecutará como un proceso semidiscontinuo. La mayoría de los nutrientes se recibirá de la fase de siembra (durante las 24 horas del tiempo de llenado) y la fuente de carbono se suministrará al lote para mantener una concentración de azúcar diana durante todo el procesamiento.

Cada lote de producción de lípidos tendrá un tiempo de ciclo total de 120 horas, 24 horas para el llenado (que recibe caldo del recipiente de siembra), 72 horas para la producción de lípidos y 24 horas para la recolección y la carga y descarga. Por lo tanto, cada recipiente de siembra deberá poder suministrar inóculo para cinco recipientes de la fase de producción de lípidos. Como se menciona anteriormente, la tasa de transferencia de siembra se espera que sea de ~xxx GMP (1/48 del volumen recogido por hora). Después de las 24 horas del tiempo de llenado, el recipiente de producción debe tener aproximadamente 1/2 del volumen recogido diana. La fuente de carbono, tal como materia básica celulósica (a concentración de ~70 % de azúcar), se añadirá para mantener una concentración de azúcar diana durante la mayoría del tiempo de ejecución. Se añadirá un antiespumante según lo necesario para minimizar su formación. En la recolección, puede conseguirse una concentración de biomasa de al menos aproximadamente 150 g/l o al menos aproximadamente 300 g/l y un 60-80 % de aceite en la biomasa.

Puede usarse una estrategia de producción continua o semicontinua para la producción de lípidos, en un método continuo, la biomasa se recoge a la misma tasa que se llena el recipiente de producción de lípidos. En un procedimiento semicontinuo, la biomasa se recoge a intervalos regulares, con la cantidad de biomasa recogida dependiente del ciclo de producción de lípidos. Por ejemplo, en un ciclo de producción de lípidos de 72 horas, la mitad del tanque de producción que contiene la biomasa puede recogerse cada 36 horas; asimismo, puede recogerse un 25 % de la biomasa en el tanque de producción cada 18 horas, puede recogerse un 75 % de la biomasa en el tanque de producción cada 54 horas y así sucesivamente. Se requiere oxígeno para el mantenimiento celular y la producción de lípidos y se suministrará flujo de aire para proporcionar suficiente transferencia de oxígeno. El requisito de flujo de aire podría ser en el intervalo de ~0,5-1,0 vvm para conseguir OUR (tasa de captación de oxígeno) de ~40-150 mmoles/l/h. Se espera una generación de calor metabólico significativa para el proceso. Habitualmente se usa una relación de 0,113 kcal/mmol de captación de O₂ para estimar la generación de calor metabólico por microorganismos y puede producirse una generación de calor estimado de ~6-7 kcal/l/h. Algo del calor puede eliminarse por el flujo de aire, pero aun se requerirá una capacidad significativa de eliminación de calor para mantener la temperatura diana. Puede requerirse control del pH por un ácido (por ejemplo, ácido sulfúrico) y/o una base (cáustica) para mantener el pH diana para la alta productividad de lípidos.

Otra información/consideraciones

El coste de fermentación puede reducirse si pueden reciclarse de forma eficaz los residuos de fermentación (tal como el medio líquido o la biomasa deslipidada).

5 El rendimiento de conversión de azúcar en biomasa probablemente será ~45-55 % (en base molar) y el rendimiento de conversión de azúcar en aceite probablemente será ~30-40 %.

Para minimizar el tiempo de inactividad potencial debido a los fallos del equipo o anomalías de los lotes, deben considerarse recipientes adicionales de siembra y producción de lípidos para el diseño de la planta.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un aceite biológico que comprende cultivar un microorganismo del reino *Stramenopile*, en el que dicho microorganismo es un traustocóquitrido, seleccionado de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* y *Ulkenia*, por fermentación heterotrófica, en el que más de un 50 % a un 99 % de los ácidos grasos insaturados en dicho aceite biológico son ácidos grasos poliinsaturados, y en el que dicha fermentación se realiza en un fermentador no estéril.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho microorganismo es resistente o degrada componentes de materia básica seleccionados del grupo que consiste en lignina, hemicelulosa, aceite vegetal, polisacáridos extracelulares vegetales y combinaciones de los mismos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho microorganismo produce aceite en forma de triglicéridos en una cantidad de un 25 % a un 85 % en peso de su biomasa seca.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además realizar autólisis o lisis inducida de dicho microorganismo después de que dicho microorganismo haya producido aceite en una cantidad de un 30 % a un 90 % en peso de su biomasa seca.
5. El método de la reivindicación 1, que comprende además inducir lisis de dicho microorganismo exponiendo dicho microorganismo a una condición favorable para lisis seleccionada del grupo que consiste en un pH, una temperatura, la presencia de una enzima, la presencia de un detergente, alteración física y combinaciones de los mismos.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la fermentación usa una materia básica que comprende celulosa.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la materia básica que comprende celulosa comprende una fuente de celulosa seleccionada del grupo que consiste en gramínea, caña de azúcar, residuos agrícolas, papel residual, aguas residuales, madera, un organismo del reino *Viridiplantae* y combinaciones de los mismos.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha fermentación se realiza en un fermentador seleccionado del grupo que consiste en fermentadores de polímero reforzado con fibra, fermentadores de compuesto de matriz metálica, fermentadores de compuesto de matriz cerámica, fermentadores de compuesto termoplástico, fermentadores metálicos, fermentadores de acero con carbono recubierto de epoxi, fermentadores de acero con carbono recubierto de plástico, fermentadores de plástico, fermentadores de fibra de vidrio y fermentadores de hormigón.
9. El método de la reivindicación 1, en el que dicha fermentación se realiza en un fermentador que se sumerge en agua.
10. El método de la reivindicación 1, en el que dicha fermentación se realiza en fermentadores que tienen sistemas de refrigeración conectados en serie de modo que el efluente de agua de refrigeración de un primer fermentador o un conjunto de fermentadores en la serie se usa como suministro de agua de refrigeración para un segundo fermentador o conjunto de fermentadores en la serie.
11. El método de la reivindicación 1, en el que dicha fermentación se realiza en fermentadores que tienen sistemas de gas conectados en serie de modo que el escape de dispersión de un primer fermentador o un conjunto de fermentadores en la serie se usa como suministro de gas para un segundo fermentador o conjunto de fermentadores en la serie.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para producir biodiésel, que comprende además transesterificar aceite biológico para producir biodiésel.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha transesterificación de aceite biológico se realiza usando un alcohol derivado de un proceso de producción de alcohol.
14. El método de la reivindicación 12, que comprende además usar glicerol resultante de dicha transesterificación de aceite biológico como fuente de carbono para un posterior proceso de fermentación para producir un alcohol o un aceite biológico.
15. El método de la reivindicación 14, en el que dicho proceso de fermentación posterior cultiva un microorganismo que puede usar dicho glicerol como fuente de carbono.
16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para producir biocombustible de aviones, que comprende además craquear dicho aceite biológico para producir biocombustible de aviones.

17. El método de la reivindicación 1, en el que dicho aceite biológico comprende más de un 50 % a un 75 % en peso de ácidos grasos poliinsaturados.
- 5 18. El método de la reivindicación 1, en el que dicho aceite biológico se produce a una tasa de 5 g/l/día a 70 g/l/día.
19. El método de la reivindicación 1, en el que dicho aceite biológico se produce a una tasa de 30 g/l/día a 70 g/l/día.
20. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo de dicho microorganismo consigue una densidad celular de 10 g/l a 300 g/l.
- 10 21. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo de dicho microorganismo consigue una densidad celular de 150 g/l a 250 g/l.
22. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 de producción de biodiésel, que comprende usar nutrientes que comprenden medio reciclado para producir un aceite biológico.
- 15 23. El método de la reivindicación 22, en el que dicho medio reciclado se selecciona del grupo que consiste en biomasa deslipidada, biomasa hidrolizada, biomasa parcialmente hidrolizada, sales recicladas, aminoácidos reciclados, carbohidratos extracelulares reciclados, glicerol reciclado, biomasa de levadura reciclada y combinaciones de los mismos.
- 20 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 16 de producción de biocombustible de aviones, que comprende usar nutrientes que comprenden medios reciclados para producir un aceite biológico.
- 25 25. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 de producción de biodiésel, que comprende usar un sistema de fermentación que comprende una fase de siembra continua y una fase de producción de lípidos para producir un aceite biológico.
- 30 26. El método de la reivindicación 25, en el que dicha fase de siembra continua produce biomasa de dicho microorganismo de modo que de un 10 % a un 95 % de la producción de biomasa total de dicho microorganismo se consigue durante dicha fase de siembra continua.
27. El método de la reivindicación 25, en el que dicha fase de producción de lípidos se realiza como un proceso semidiscontinuo.
- 35 28. El método de la reivindicación 25, en el que dicha fase de producción de lípidos produce lípidos de modo que de un 10 % a un 95 % de la producción de lípidos total de dicho microorganismo se consigue durante dicha fase de producción de lípidos.
- 40 29. Un método de acuerdo con la reivindicación 16 de producción de biocombustible de aviones, que comprende usar un sistema de fermentación que comprende una fase de siembra continua y una fase de producción de lípidos para producir un aceite biológico.

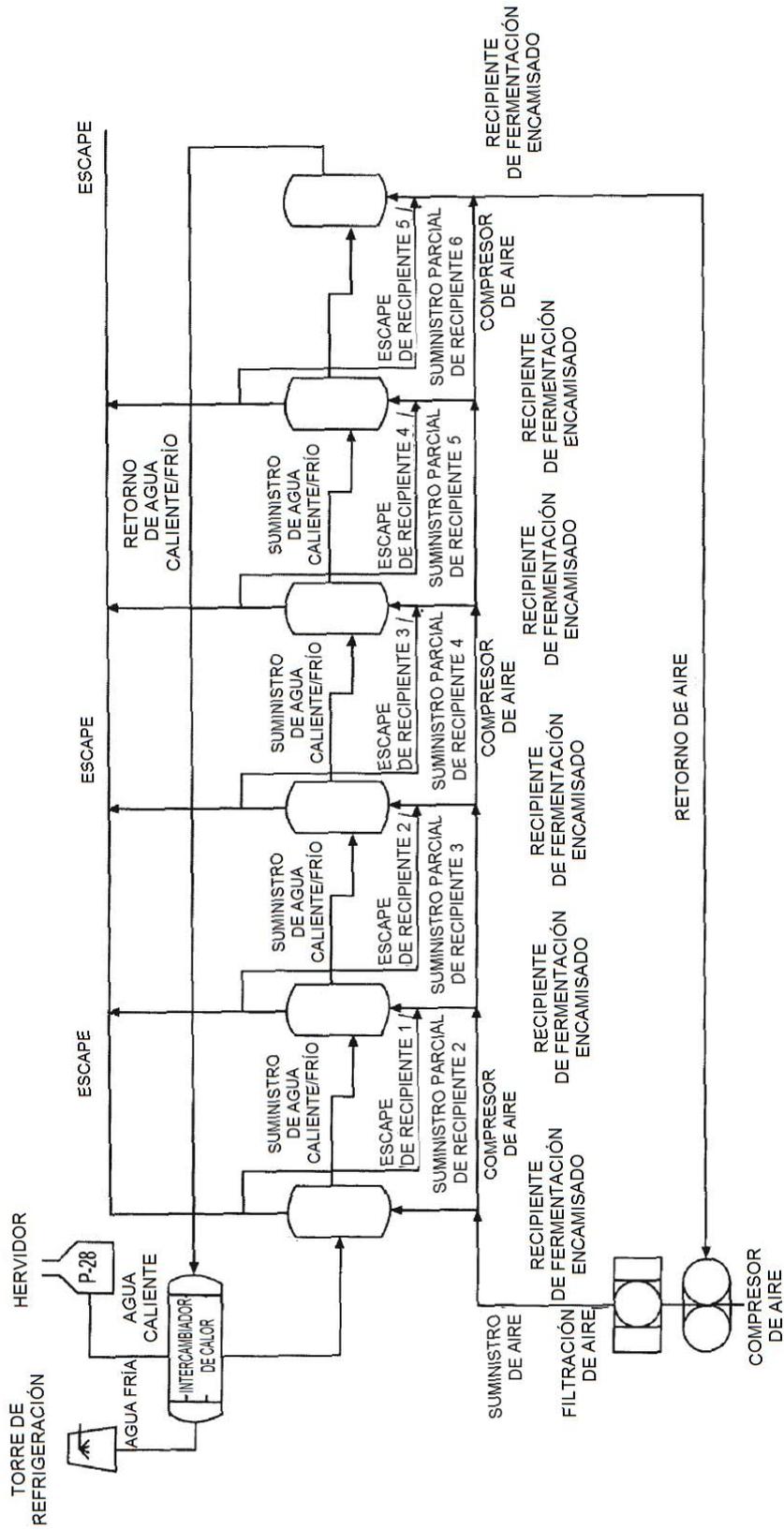


FIG. 2

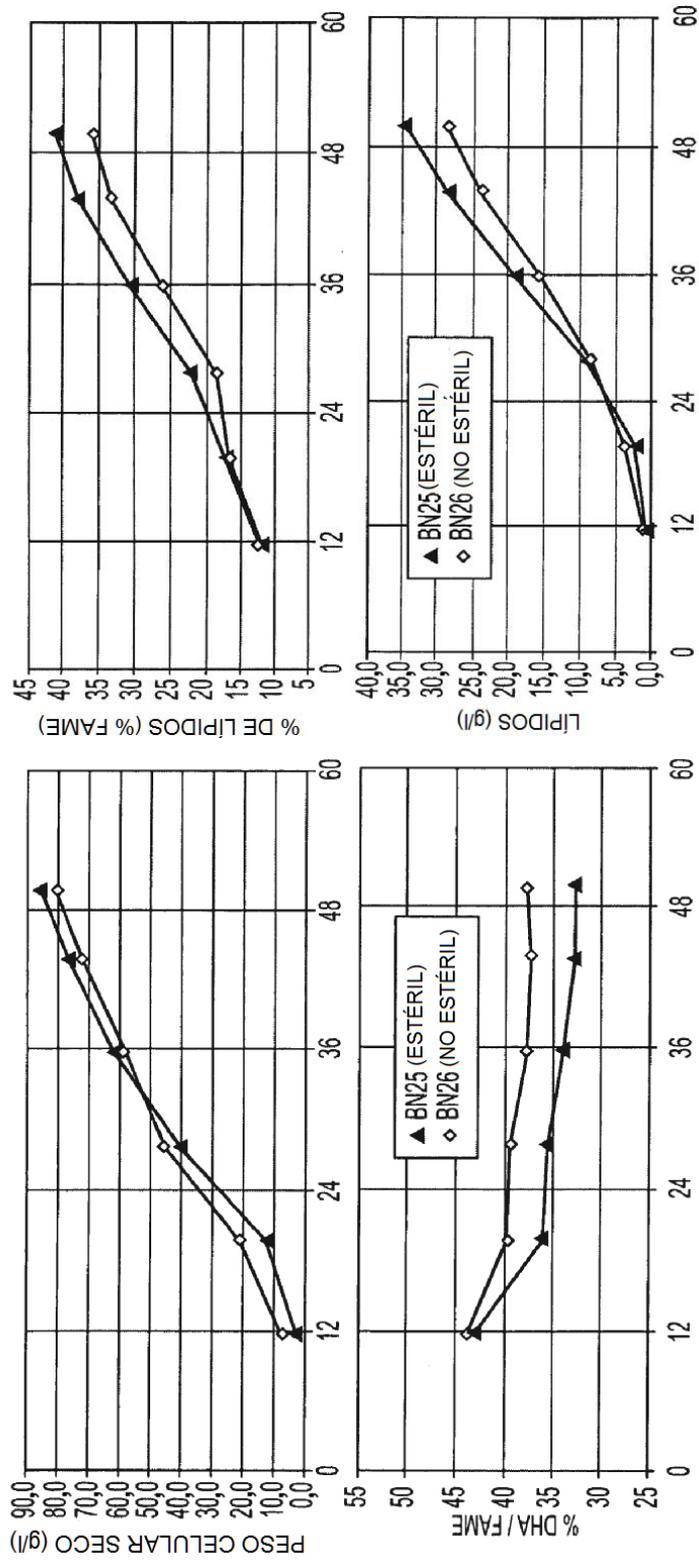


FIG. 3

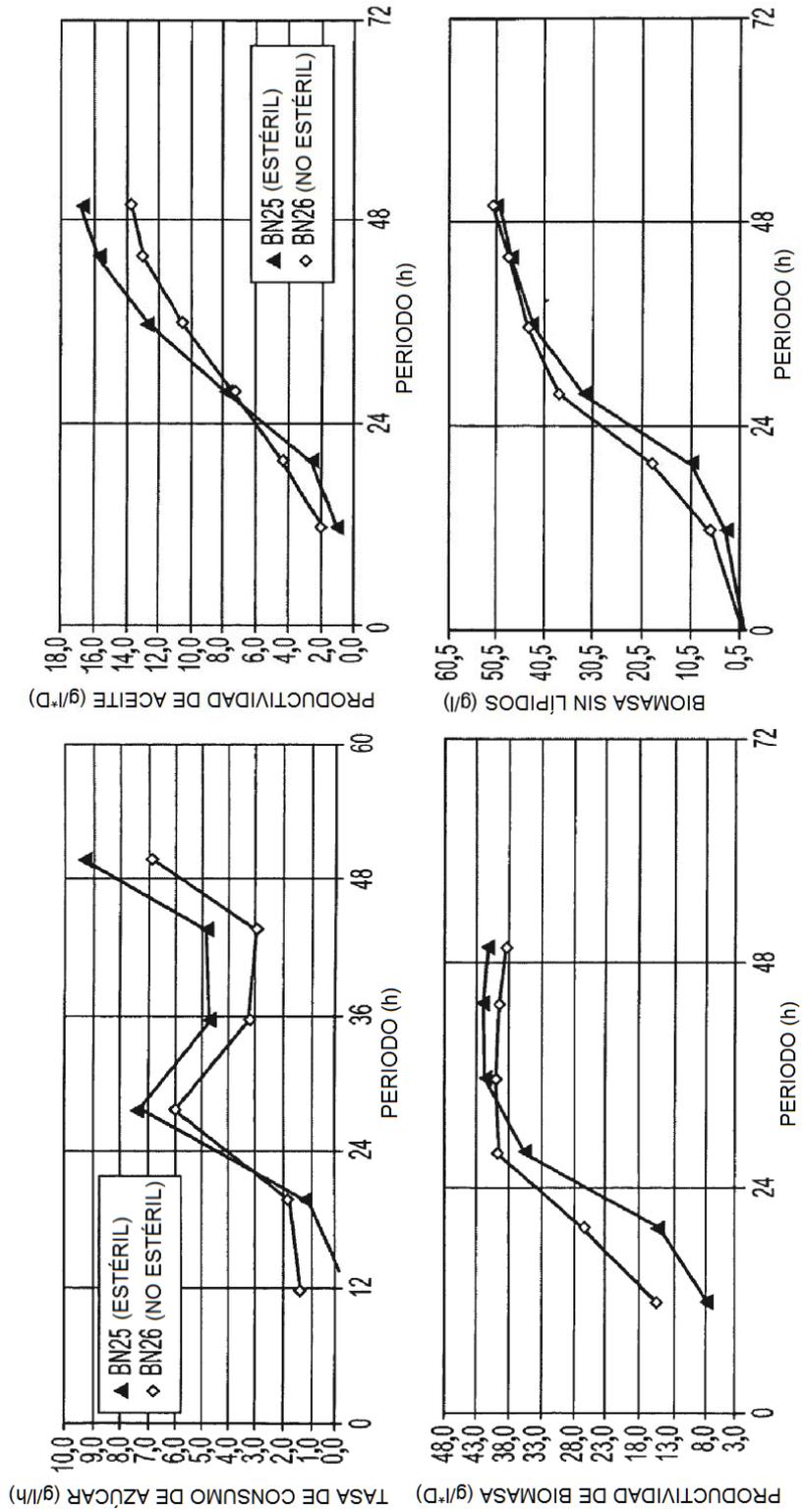


FIG. 4

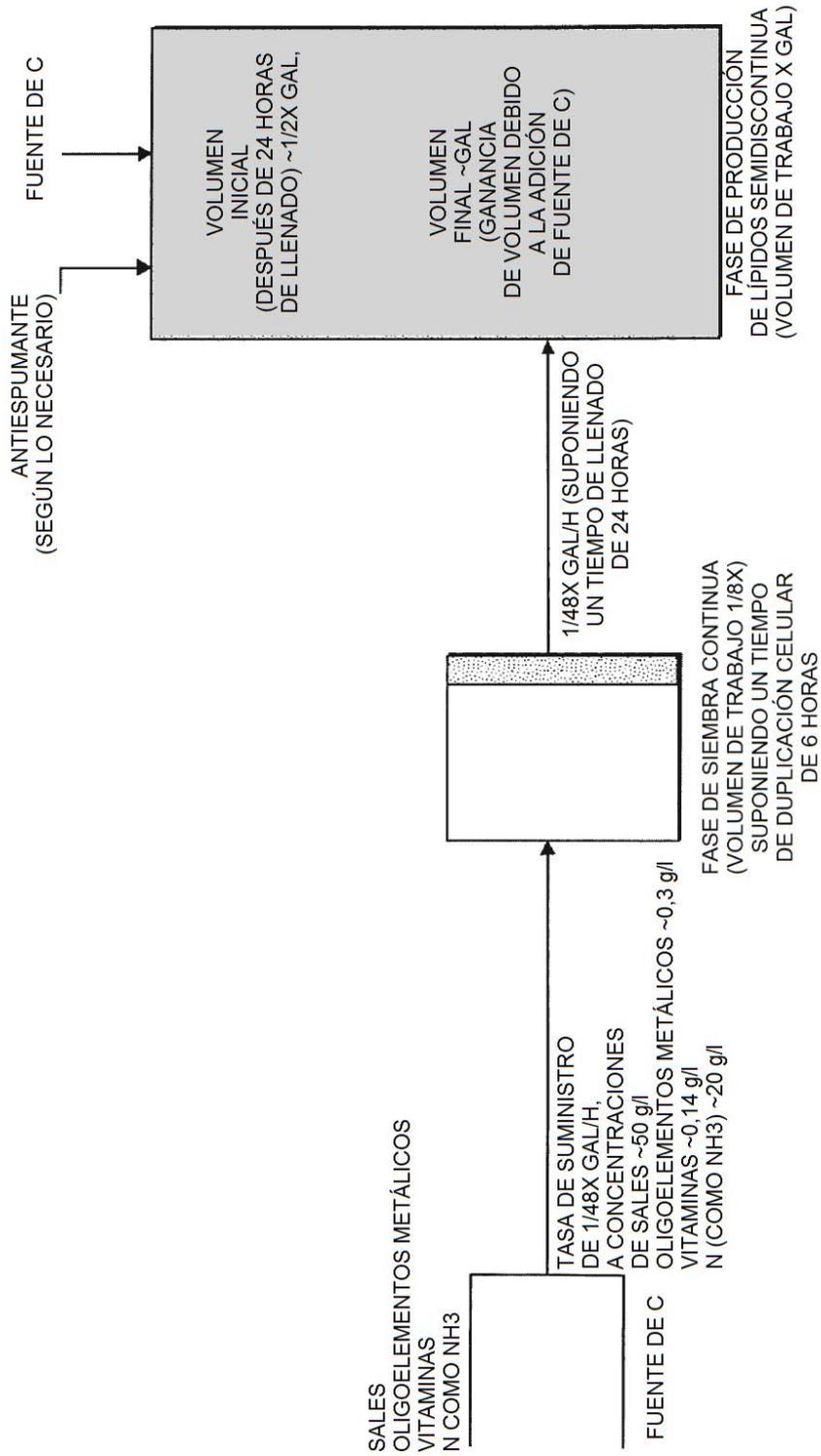


FIG. 5