

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 489**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

**C12N 15/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2011 PCT/US2011/038463**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11150410**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11787551 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2576800**

54 Título: **Método para producir aceites a partir de Prototheca**

30 Prioridad:

**29.12.2010 US 201061428192 P**

**16.11.2010 US 414393 P**

**18.08.2010 US 374992 P**

**28.05.2010 US 349774 P**

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

**02.07.2019**

73 Titular/es:

**CORBION BIOTECH, INC. (100.0%)**

**One Tower Place, Suite 600**

**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**FRANKLIN, SCOTT;**

**SOMANCHI, ARAVIND;**

**WEE, JANICE;**

**RUDENKO, GEORGE;**

**MOSELEY, JEFFREY L y**

**RAKITSKY, WALT**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 718 489 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).

**DESCRIPCION**

Método para producir aceites a partir de *Prototheca*

5 La presente divulgación se relaciona con la producción de aceites, combustibles, y oleoquímicos preparados a partir de microorganismos. En particular, la divulgación se relaciona con microalgas oleaginosas, los métodos de cultivo de las mismas para la producción de compuestos útiles, incluyendo lípidos, ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, y alcanos, así como también métodos y reactivos para modificarlas genéticamente con el objetivo de mejorar la eficiencia productiva y modificar el tipo y la composición de los aceites que ellas producen.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 Combustible fósil es un término general para los depósitos geológicos de combustible enterrado de materiales orgánicos, formados a partir de plantas y animales putrefactos que se han convertido en aceite crudo, hulla, gas natural, o aceites pesados por exposición al calor y presión en la corteza de la tierra durante miles de millones de años. Los combustibles fósiles son un recurso finito, no renovable. El incremento de la demanda de energía por la economía global ha traído además el aumento de la presión en el costo de los hidrocarburos. Aparte de la energía, muchas industrias, que incluyen los fabricantes de plásticos y sustancias químicas, confían mucho en la disponibilidad de los hidrocarburos como una materia prima para sus proceso de fabricación. Las alternativas costo-efectivas a las fuentes actuales de suministro pudieran ayudar a mitigar la presión ascendente en cuanto a los costos de energía y estas materias prima.

25 La publicación PCT núm. 2008/151149 describe métodos y materiales para cultivar microalgas para la producción de aceite y particularmente ejemplifica la producción de combustible diesel a partir de aceite producido por las microalgas *Chlorella protothecoides*. Sigue siendo una necesidad los métodos mejorados para producir aceite en microalgas, particularmente los métodos que producen aceites con longitud de cadena más corta y un grado más alto de saturación y sin pigmentos, con mayor rendimiento y eficiencia. La presente invención satisface esta necesidad.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

35 La presente invención proporciona un método para producir un aceite de triglicéridos o producto a base de aceite, el método comprendiendo:

- a. cultivar una población de células de microalgas del género *Prototheca*, en un medio de cultivo hasta que por lo menos el 10% del peso celular seco de las células microbianas oleaginosas sea aceite de triglicéridos; y
- b. aislar la composición de aceite de triglicéridos a partir de las células microbianas oleaginosas;

40 en donde las células comprenden:

- i) aceite de triglicéridos que tiene un perfil de ácidos grasos de por lo menos aproximadamente el 35% de ácidos grasos saturados; y
- ii) un gen KAS (ceto-acil ACP sintasa) exógeno, o un knockout de un gen KAS endógeno.

45 En algunas de las células recombinantes discutidas en la presente descripción, la célula comprende un gen desaturasa endógeno mutado, en donde la mutación inactiva el gen o desaturasa.

50 La presente invención proporciona un método para preparar un producto a base de aceite como se detalla en las reivindicaciones. En una realización, el método comprende (a) cultivar una célula como se discutió anteriormente hasta que la célula es al menos 10%, preferiblemente al menos 15% lípido en peso seco, (b) separar el lípido de los componentes de biomasa solubles en agua, y (c) someter el lípido a al menos una reacción química seleccionada del grupo que consiste de: saponificación; metatesis; hidrólisis ácida; hidrólisis alcalina; hidrólisis enzimática; hidrólisis catalítica; hidrólisis con agua comprimida caliente; una reacción de hidrólisis catalítica en donde el lípido se separa en glicerina y ácidos grasos; una reacción de aminación para producir compuestos de nitrógeno grasos; una reacción de ozonólisis para producir ácidos mono y dibásicos; una reacción de separación de triglicéridos seleccionada del grupo que consiste de separación enzimática y separación por presión; una reacción de condensación que sigue una reacción de hidrólisis; una reacción de hidroprocesamiento; una reacción de hidroprocesamiento y una reacción de desoxigenación o una reacción de condensación antes de o simultánea a la reacción de hidroprocesamiento; una reacción de eliminación de gas; una reacción de desoxigenación seleccionada del grupo que consiste de una reacción de hidrogenólisis, hidrogenación, una reacción de hidrogenación-hidrogenólisis consecutiva, una reacción de hidrogenólisis-hidrogenación consecutiva, y una reacción de hidrogenación-hidrogenólisis combinada; una reacción de condensación siguiendo una reacción de desoxigenación; una reacción de esterificación; una reacción de interesterificación; una reacción de transesterificación; una reacción

de hidroxilación; y una reacción de condensación siguiendo una reacción de hidroxilación, con lo cual se produce un producto de base aceite.

5 En algunos casos, el producto de base aceite se selecciona de jabón o un producto combustible. En algunas realizaciones, el producto de base aceite es un producto combustible seleccionado del grupo que consiste de biodiesel, diesel renovable, y combustible de reactor. En algunos casos, el producto combustible es biodiesel con uno o más de los siguientes atributos: (i) 0.01- 0.5 mcg/g, 0.025-0.3 mcg/g, preferentemente 0.05-0.244 mcg/g, carotenoides totales; (ii) menos que 0.01 mcg/g, menos que 0.005 mcg/g, preferentemente menos que 0.003 mcg/g, licopeno; (iii) menos que 0.01 mcg/g, menos que 0.005 mcg/g, preferentemente menos que 0.003 mcg/g, beta caroteno; (iv) 0.01-0.5 mcg/g, 0.025-0.3 mcg/g, preferentemente 0.045-0.268 mcg/g, clorofila A; (v) 1-500 mcg/g, 35-175 mcg/g, preferentemente 38.3-164 mcg/g, gamma tocoferol; (vi) menos que 1%, menos que 0.5%, preferentemente menos que 0.25%, brassicasterol, campesterol, estignasterol, o beta-sitosterol; (vii) 100-500 mcg/g, 225-350 mcg/g, preferentemente 249.6-325.3 mcg/g, tocotrienoles totales; (viii) 0.001-0.1 mcg/g, 0.0025-0.05 mcg/g, preferentemente 0.003-0.039 mcg/g, luteína; o (ix) 10-500 mcg/g, 50-300 mcg/g, preferentemente 60.8-261.7 mcg/g, tocoferoles. En algunos casos, el producto combustible es diesel renovable que tiene un T10-T90 de al menos 20°C, 40°C o 60°C. En algunos casos, el producto combustible es combustible de reactor que cumple con la especificación D1655 de HRJ-5 y/o ASTM.

20 En algunos casos, el aceite triglicérido se aísla de un microbio que comprende uno o más genes exógenos. En algunas realizaciones, el uno o más genes exógenos codifican una acil graso-ACP tioesterasa. En algunos casos, la acil graso-ACP tioesterasa tiene actividad de hidrólisis hacia los sustratos de la acil graso-ACP de longitud de cadena C14. En algunas realizaciones, el microbio comprende además un gen desaturasa endógeno mutado, en donde la mutación inactiva el gen o desaturasa.

25 La célula microbiana oleaginosa, comprende un aceite de triglicéridos con un perfil de lípidos de por lo menos el 35% de ácidos grasos saturados. El perfil de ácidos grasos de aceite de triglicéridos puede seleccionarse del grupo que consiste de al menos aproximadamente 1% C8:0, al menos aproximadamente 1% C10:0, al menos aproximadamente 1% C12:0, al menos aproximadamente 2% C14:0, al menos aproximadamente 30% C16:0, al menos aproximadamente 5% C18:0, al menos aproximadamente 60% C18:1, menos que aproximadamente 7% C18:2, y al menos aproximadamente 35% ácidos grasos saturados. En algunos casos, la célula microbiana oleaginosa comprende un gen exógeno, y opcionalmente, una desaturasa endógena de la célula microbiana oleaginosa se inactiva o muta para tener menos actividad enzimática.

35 En algunos casos, el perfil de ácido graso del aceite triglicérido es similar al perfil de ácido graso de un aceite de origen natural. En algunos casos, el aceite de origen natural es seleccionado del grupo que consiste de manteca de cacao, aceite de nuez de coco, aceite de palma, aceite de almendra de palma, manteca de karité, cebo y manteca de res. En algunos casos, el perfil de ácido graso del aceite triglicérido comprende un perfil seleccionado del grupo que consiste de, las cantidades totales combinadas de C8:0 y C10:0 es al menos aproximadamente 10%, la cantidad total combinada de C10:0, C12:0, y C14:0 es al menos aproximadamente 50%, la cantidad total combinada de C16:0, C18:0 y C18:1 es al menos aproximadamente 60%, la cantidad total combinada de C18:0, C18:1 y C18:2 es al menos aproximadamente 60%, la cantidad total combinada de C14:0, C16:0, C18:0 y C18:1 es al menos aproximadamente 60%, y la cantidad total combinada de C18:1 y C18:2 es menos que aproximadamente 30%. En algunos casos, el perfil de ácido graso del aceite triglicérido comprende una relación de ácidos grasos seleccionada del grupo que consiste de relación C8:0 a C10:0 de al menos aproximadamente 5 a 1, relación C10:0 a C12:0 de al menos aproximadamente 6 a 1, relación C12:0 a C14:0 de al menos aproximadamente 5 a 1, relación C14:0 a C12:0 de al menos aproximadamente 7:1, y relación C14:0 a C16:0 de al menos aproximadamente 1 a 2.

50 En algunos casos, la desaturasa endógena es seleccionada del grupo que consiste de estearoil ACP desaturasa y desaturasa de ácido graso delta 12. En algunos casos, el gen exógeno es seleccionado del grupo que consiste de un gen que codifica una acil-ACP tioesterasa. En algunos casos, el gen exógeno codifica una acil-ACP tioesterasa seleccionada del grupo que consiste de aquellas identificadas en la Tabla 4. En algunos casos, la célula microbiana oleaginosa comprende además un gen que codifica una sacarosa invertasa.

55 La célula microbiana oleaginosa es una célula del género de microalgas *Prototheca*, en varias realizaciones seleccionada de *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca stagnora*, *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis*, *Prototheca zopfii*.

En algunos casos, la célula microbiana oleaginosa es una célula del género *Prototheca moriformis*.

60 En algunos casos, el aceite de origen natural es manteca de cacao y el gen exógeno comprende un gen de tioesterasa de *Carthamus tinctorus*. En algunos casos, el aceite de origen natural es aceite de nuez de coco. En algunos casos, el aceite de origen natural es aceite de palma y el gen exógeno comprende un gen de tioesterasa de *Elaeis guiniensis*, un gen de tioesterasa de *Cuphea hookeriana*, una combinación de un gen KAS IV de *Cuphea hookeriana* y un gen FATB2 de *Cuphea wrightii*, o un constructo diseñado para interrumpir un gen KAS II endógeno. En algunos casos, el aceite de origen natural es aceite de almendra de palma y el gen exógeno comprende una

combinación de un gen FATB2 de *Cuphea wrightii* y un constructo diseñado para interrumpir un gen SAD2B endógeno. En algunos casos, el aceite de origen natural es manteca de karité. En algunos casos, el aceite de origen natural es cebo de res. En algunos casos, el aceite de origen natural es manteca y el gen exógeno comprende una combinación del gen de tiosterasa *U. californica* y un constructo diseñado para interrumpir un gen SAD2B endógeno, una combinación de un gen de tiosterasa de *Garcinia mangostana* y un constructo diseñado para interrumpir un gen SAD2B endógeno, un gen de tiosterasa de *Brassica napus*, o un gen de tiosterasa de *Cuphea hookeriana*.

En algunos casos, la composición de aceite triglicérido microbiano oleaginoso comprende además un atributo seleccionado del grupo que consiste de: (i) menos que 0.3 mcg/g carotenoides totales; (ii) menos que 0.005 mcg/g licopeno; (iii) menos que 0.005 mcg/g beta caroteno; (iv) menos que 0.3 mcg/g clorofila A; (v) menos que 175 mcg/g gamma tocoferol; (vi) menos que 0.25% brassicasterol, campesterol, estignasterol, o beta-sitosterol; (vii) menos que 350 mcg/g tocotrienoles totales; (viii) menos que 0.05 mcg/g luteína; o (ix) menos que 275 mcg/g tocoferoles.

La presente invención proporciona un método como se expone en las reivindicaciones para producir una composición de aceite triglicérido microbiano oleaginoso que tiene un perfil de ácido graso seleccionado del grupo que consiste de al menos aproximadamente 1% C8:0, al menos aproximadamente 1% C10:0, al menos aproximadamente 1% C12:0, al menos aproximadamente 2% C14:0, al menos aproximadamente 30% C16:0, al menos aproximadamente 5% C18:0, al menos aproximadamente 60% C18:1, menos que aproximadamente 7% C18:2, en donde el método comprende las etapas de: (a) cultivar una población de células microbianas oleaginosas en un medio de cultivo hasta al menos 10% del peso seco de la célula de las células microbianas oleaginosas es aceite triglicérido; y (b) aislar la composición de aceite triglicérido de las células microbianas oleaginosas. En varias realizaciones, la composición de aceite triglicérido se produce mediante el cultivo de una población de células microbianas oleaginosas o células microbianas oleaginosas recombinantes del género *Prototheca* como se describió anteriormente. Como se expone en las reivindicaciones, el aceite de triglicéridos tiene un perfil de ácidos grasos de por lo menos aproximadamente el 35% de ácidos grasos saturados.

El método para preparar un producto de base aceite como se reivindica puede comprender las etapas de: (a) someter la composición de aceite triglicérido microbiano oleaginoso, como se describió anteriormente en relación con el decimosexto aspecto de la invención, a al menos una reacción química seleccionada del grupo que consiste de: saponificación; metatesis; hidrólisis ácida; hidrólisis alcalina; hidrólisis enzimática; hidrólisis catalítica; hidrólisis con agua comprimida caliente; una reacción de hidrólisis catalítica en donde el lípido se separa en glicerina y ácidos grasos; una reacción de aminación para producir compuestos de nitrógeno grasos; una reacción de ozonólisis para producir ácidos mono y dibásicos; una reacción de separación de triglicéridos seleccionada del grupo que consiste de separación enzimática y separación por presión; una reacción de condensación que sigue una reacción de hidrólisis; una reacción de hidrogenación; una reacción de hidrogenación y una reacción de desoxigenación o una reacción de condensación antes de o simultánea a la reacción de hidrogenación; una reacción de eliminación de gas; una reacción de desoxigenación seleccionada del grupo que consiste de una reacción de hidrogenólisis, hidrogenación, una reacción de hidrogenación-hidrogenólisis consecutiva, una reacción de hidrogenólisis-hidrogenación consecutiva, y una reacción de hidrogenación-hidrogenólisis combinada; una reacción de condensación siguiendo una reacción de desoxigenación; una reacción de esterificación; una reacción de interesterificación; una reacción de transesterificación; una reacción de hidroxilación; y una reacción de condensación siguiendo una reacción de hidroxilación; y (b) aislar el producto de la reacción de otros componentes.

En algunos casos, el producto de base aceite es seleccionado del grupo que consiste de un jabón, un combustible, un fluido dieléctrico, un líquido hidráulico, un plastificante, un lubricante, un fluido de transferencia de calor, y un fluido de trabajo de metales. En algunos casos, el producto de base aceite es un producto combustible seleccionado del grupo que consiste de: (a) biodiesel; (b) diesel renovable; y (c) combustible de reactor.

En algunos casos, el producto combustible es biodiesel con uno o más de los siguientes atributos: (i) menos que 0.3 mcg/g carotenoides totales; (ii) menos que 0.005 mcg/g licopeno; (iii) menos que 0.005 mcg/g beta caroteno; (iv) menos que 0.3 mcg/g clorofila A; (v) menos que 175 mcg/g gamma tocoferol; (vi) menos que 0.25% brassicasterol, campesterol, estignasterol, o beta-sitosterol; (vii) menos que 350 mcg/g tocotrienoles totales; (viii) menos que 0.05 mcg/g luteína; o (ix) menos que 275 mcg/g tocoferoles.

En algunos casos, el producto combustible es diesel renovable que tiene una T10-T90 de al menos 20°C, 40°C o 60°C.

En algunos casos, el producto combustible es combustible de reactor que cumple con la especificación D1655 de HRJ-5 y/o ASTM.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un cromatograma del diesel renovable producido a partir del aceite de triglicérido de

*Prototheca*.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención surge a partir del descubrimiento de que la *Prototheca* y ciertos microorganismos relacionados tienen propiedades inesperadamente ventajosas para la producción económica y en grandes cantidades de aceites, combustibles, y otras composiciones de hidrocarburos o lipídicas, así como del descubrimiento de métodos y reactivos para alterar genéticamente estos microorganismos para mejorar estas propiedades. Los aceites producidos por estos microorganismos pueden usarse en el combustible para la 10 transportación, en la industria oleoquímica y/o alimenticia y cosmética, entre otras aplicaciones. La transesterificación de los lípidos produce ésteres de ácidos grasos de cadena larga útiles como biodiesel. Otros procesos enzimáticos y químicos pueden ajustarse para producir ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, alcanos y alquenos. En algunas aplicaciones, se produce diesel renovable, combustible de reactor, u otros compuestos hidrocarburos. La presente invención también proporciona métodos para cultivar microalgas con una productividad 15 elevada y un alto rendimiento lipídico, y/o para la producción más rentable de las composiciones descritas en la presente.

Esta descripción detallada de la invención se divide en secciones para conveniencia del lector. La Sección I proporciona las definiciones de los términos usados en la presente. La Sección II proporciona una descripción de las 20 condiciones de cultivo útiles en los métodos de la invención. La Sección III proporciona una descripción de los materiales y métodos de ingeniería genética. La Sección IV proporciona una descripción de la modificación genética de microorganismos (*por ejemplo, Prototheca*) para permitir la utilización de sacarosa. La Sección V proporciona una descripción de la modificación genética de microorganismos (*por ejemplo, Prototheca*) para modificar la biosíntesis de los lípidos. La sección VI describe métodos para producir combustibles y sustancias químicas. La Sección VII describe los ejemplos y realizaciones de la invención. La descripción detallada de la invención es seguida por los 25 ejemplos que ilustran varios aspectos y realizaciones de la invención.

## I. DEFINICIONES

30 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la materia a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a una persona experta una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton y otros, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (2da ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *The Glossary of Genetics*, 5ta Ed., R. Rieger y otros (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). Como se usan en este documento, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos, a menos que se 35 especifique de otra manera.

40 “Activo en microalgas” se refiere a un ácido nucleico que es funcional en las microalgas. Por ejemplo, un promotor que se ha usado para manejar un gen de resistencia a los antibióticos para impartir resistencia antibiótica a una microalga transgénica está activo en las microalgas.

45 “Proteína portadora de acilos” o “ACP” es una proteína que se une a una cadena acilo en crecimiento durante la síntesis de ácidos grasos como un tiol éster al tiol distal de la porción de 4'-fosfopantoteína y comprende un componente del complejo de la ácido graso sintasa.

50 Una “molécula de acil-CoA” o “acil-CoA”, es una molécula que comprende una porción acilo covalentemente unida a la coenzima A a través de un enlace tiol éster en el tiol distal de la porción de 4'-fosfopantoteína de la coenzima A.

55 “Porcentaje de área”, se refiere al área de picos observados usando los métodos de detección FAME GC/FID, en los que cada ácido graso en la muestra se convierte en un metil éster de ácido graso (FAME) antes de la detección. Por ejemplo, se observa un pico separado para un ácido graso de 14 átomos de carbono sin insaturación (C14:0) comparado con cualquier otro ácido graso tal como C14:1. El área pico para cada clase de FAME es directamente proporcional a su por ciento de composición en la mezcla y se calcula basado en la suma de todos los picos presentes en la muestra (es decir, [área bajo pico específico/ área total de todos los picos medidos] X 100). Al referirse a los perfiles lipídicos de los aceites y las células de la invención, “al menos 4% de C8-C14” significa que al menos el 4% de los ácidos grasos totales en la célula o en la composición del glicerolípidos extraídos, tiene una longitud de cadena que incluye 8, 10, 12 ó 14 átomos de carbono.

60 “Axénico”, es un cultivo de un organismo libre de contaminación por otros organismos vivos.

65 “Biodiesel”, es un éster de alquilo de ácidos grasos producido biológicamente adecuado para su uso como combustible en un motor de diesel.

“Biomasa”, es el material producido por el crecimiento y/o propagación de células. La biomasa puede contener células y/o contenido intracelular, así como material extracelular, incluye pero no se limita a, los compuestos secretados por una célula.

5 “Biorreactor”, es un recinto total o parcial donde se cultivan las células, opcionalmente en suspensión.

10 "Catalizador" es un agente, tal como una molécula o un complejo macromolecular, capaz de facilitar o promover una reacción química de un reactante a su producto sin convertirse en una parte del producto. Un catalizador aumenta la velocidad de una reacción, después de lo cual, el catalizador puede actuar sobre otro reactante para formar el producto. Un catalizador generalmente disminuye la energía de activación total requerida para la reacción, de modo que esta ocurre más rápidamente o a una temperatura más baja. Así, un equilibrio de la reacción puede lograrse más rápidamente. Los ejemplos de catalizadores incluyen enzimas, que son catalizadores biológicos; calor, que es un catalizador no biológico; y metales usados en los procesos de refinamiento de los aceites fósiles.

15 "Material celulósico", es el producto de la digestión de la celulosa, incluyendo glucosa y xilosa, y opcionalmente compuestos adicionales como disacáridos, oligosacáridos, lignina, furfural y otros compuestos. Los ejemplos no limitantes de fuentes de material celulósico incluyen bagazo de caña de azúcar, pulpa de azúcar de remolacha, rastrojos de maíz, astillas de madera, aserrín y pasto varilla.

20 "Co-cultivo", y variantes de éste como "co-cultivar" y "co-fermentar", se refieren a la presencia de dos o más tipos de células en el mismo biorreactor. Los dos o más tipos de células pueden ser ambos microorganismos, como las microalgas, o pueden ser una célula de microalgas cultivada con un tipo celular diferente. Las condiciones del cultivo pueden ser aquellas que fomentan el crecimiento y/o la propagación de los dos o más tipos celulares o aquellas que facilitan el crecimiento y/o proliferación de una, o un subconjunto de las dos o más células, mientras se mantiene el crecimiento celular para el resto.

25 "Cofactor", es cualquier molécula, distinta del sustrato, necesaria para que una enzima pueda realizar su actividad enzimática.

30 "ADN complementario" o "ADNc", define a una copia de ADN del ARNm, normalmente obtenida por transcripción inversa del ARN mensajero (ARNm) o por amplificación (por ejemplo, vía reacción en cadena de la polimerasa ("PCR")).

35 "Cultivado", y variantes de esta como "cultivo" y "fermentado", se refieren al fomento intencional del crecimiento (incremento del tamaño celular, contenido celular, y/o actividad celular) y/o propagación (incremento en el número de células vía mitosis) de una o varias células mediante el uso de condiciones de cultivo seleccionadas y/o controladas. La combinación de ambos, crecimiento y propagación, puede ser nombrada como proliferación. Los ejemplos de condiciones seleccionadas y/o controladas incluyen el uso de un medio definido (con características conocidas como pH, fuerza iónica, y fuente de carbono), y condiciones específicas de temperatura, tensión de oxígeno, niveles de dióxido de carbono, y crecimiento en un biorreactor. Cultivar no se refiere al crecimiento o propagación de microorganismos en la naturaleza o en otra parte sin la intervención humana; por ejemplo, no es un cultivo el crecimiento natural de un organismo que finalmente se convierte en un fósil para producir el petróleo.

40 "Citólisis" es la lisis de células en un entorno hipotónico. La citólisis es provocada por la ósmosis excesiva, o por el movimiento del agua, hacia el interior de una célula (hiperhidratación). La célula no puede resistir la presión osmótica del agua en su interior, y explota.

45 "Comida deslipidada" y "biomasa microbiana deslipidada", es la biomasa microbiana después que el aceite (incluyendo los lípidos) se extraen o aíslan de ella, ya sea mediante el uso de extracción mecánica (es decir, ejercida por una prensa) o extracción por solvente, o ambos. La comida deslipidada tiene una cantidad reducida de aceites/lípidos comparado con la biomasa microbiana antes de la extracción o aislamiento de los aceites/lípidos, pero contiene alguna cantidad residual de aceites/lípidos.

50 "Vector de expresión" o "constructo de expresión" o "plásmido" o "constructo de ADN recombinante", se refieren a un ácido nucleico que se ha generado mediante la intervención humana, incluyendo métodos recombinantes o de síntesis química directa, con una serie de ácidos nucleicos específicos que permiten la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o un fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que se transcribe enlazado operativamente a un promotor.

55 "Gen exógeno", es un ácido nucleico que codifica para la expresión de un ARN y/o proteína que se ha introducido ("transformado") en una célula. Una célula transformada puede definirse como una célula recombinante, dentro de la cual se puede introducir un gen(es) exógeno(s) adicional(es). El gen exógeno puede ser de una especie diferente (heterólogo), o de la misma especie (homólogo) con respecto a la célula que se transforma. Así, un gen

exógeno puede incluir un gen homólogo que ocupa una localización diferente en el genoma de la célula o está bajo un control diferente, con respecto a la copia endógena del gen. Un gen exógeno puede estar presente en más de una copia en la célula. Un gen exógeno puede mantenerse en una célula como una inserción en el genoma o como una molécula episomal.

5 “Proporcionada exógenamente”, se refiere a una molécula proporcionada al medio de cultivo de un cultivo celular.

10 “Prensado con expulsor”, es un método mecánico para extraer el aceite de materias primas como la soya y las semillas de colza. Una prensa expulsora es una máquina de tornillo la cual presiona el material a través de una cavidad enjaulada en forma de barril. La materia prima entra por un lado de la prensa y la torta sale por el otro lado, mientras el aceite se filtra entre las barras de la jaula y se recoge. La máquina usa fricción y presión continua de las unidades de tornillo para mover y comprimir la materia prima. El aceite sale a través de pequeñas aberturas que no permiten que pasen los sólidos. Como la materia prima es prensada, típicamente la fricción provoca calentamiento.

15 “Acil graso-ACP tioesterasa”, es una enzima que cataliza la escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilos (ACP) durante la síntesis de los lípidos.

20 “Acil graso-CoA/aldehído reductasa”, es una enzima que cataliza la reducción de una molécula de acil-CoA a un alcohol primario.

“Acil graso-CoA reductasa”, es una enzima que cataliza la reducción de una molécula de acil-CoA a un aldehído.

25 “Aldehído graso decarbonilasa”, es una enzima que cataliza la conversión de un aldehído graso a un alcano.

“Aldehído graso reductasa”, es una enzima que cataliza la reducción de un aldehído a un alcohol primario.

30 “Fuente fija de carbono”, es una molécula o moléculas que contienen carbono, típicamente una molécula orgánica que está presente a temperatura y presión ambiente en forma sólida o líquida, que se puede utilizar por un microorganismo cultivado allí.

35 “Homogenato” es biomasa que ha sido separada físicamente.

“Hidrocarburo”, es (a) una molécula que contiene sólo átomos de hidrógeno y carbono, donde los átomos de carbono son covalentemente unidos para formar una cadena principal lineal, ramificada, cíclica, o parcialmente cíclica a la que se unen los átomos de hidrógeno. La estructura molecular de los compuestos hidrocarburos varía de la más simple, en forma de metano (CH<sub>4</sub>), que es un constituyente del gas natural, a una muy fuerte y compleja, tales como algunas moléculas como los asfaltenos encontrados en el aceite crudo, petróleo, y betún. Los hidrocarburos pueden encontrarse en forma gaseosa, líquida, o sólida, o en cualquier combinación de estas formas, y pueden tener uno o más dobles o triples enlaces entre los átomos del carbono adyacentes a la cadena principal. Por lo tanto, el término incluye alcanos, alquenos, lípidos y parafinas lineales, ramificadas, cíclicas o parcialmente cíclicas. Los ejemplos incluyen propano, butano, pentano, hexano, octano, y escualeno.

45 “Relación hidrógeno:carbono”, es la relación de átomos de hidrógeno con respecto a los átomos de carbono en una molécula sobre una base de átomo a átomo. La relación puede usarse para referirse al número de átomos de carbono y de hidrógeno en una molécula de hidrocarburo. Por ejemplo, el hidrocarburo con la relación más alta es el metano CH<sub>4</sub> (4:1).

50 “Fracción hidrofóbica”, es la porción, o fracción de un material que es más soluble en una fase hidrófoba comparado con una fase acuosa. Un fragmento hidrófobo es substancialmente insoluble en agua y normalmente es no polar.

55 “Incremento del rendimiento lipídico”, se refiere al aumento en la productividad de un cultivo microbiano, por ejemplo, incrementando el peso seco de células por litro de cultivo, aumentando el porcentaje de células que constituyen los lípidos, o incrementando la cantidad total de lípidos por litro de volumen de cultivo por unidad de tiempo.

60 El “promotor inducible”, es un promotor que media la transcripción de los genes operativamente unidos en respuesta a un estímulo particular. Los ejemplos de dichos promotores pueden ser las secuencias promotoras que se inducen en condiciones de cambio de pH o niveles de nitrógeno.

65 “En unión operativa”, es la unión funcional entre dos secuencias de ácidos nucleicos, como una secuencia control (típicamente un promotor) y la secuencia unida (típicamente una secuencia que codifica a una proteína,

también llamada secuencia codificante). Un promotor está en una unión operativa con un gen exógeno si puede mediar la transcripción del gen.

5 “In situ”, significa “en el lugar” o “en su posición original”.

10 “Concentración limitante de un nutriente”, es la concentración de un compuesto en un cultivo que limita la propagación de un organismo en el cultivo. Una concentración “no limitante de un nutriente” es una concentración que ayuda a la propagación máxima durante un período dado del cultivo. Así, el número de células producidas durante un período dado del cultivo es más bajo en presencia de una concentración limitante de un nutriente que cuando el nutriente es no limitante. Se dice que un nutriente está “en exceso” en un cultivo, cuando el nutriente está presente en una concentración mayor que la necesaria para la propagación máxima.

15 “Lipasa”, es una enzima soluble en agua que cataliza la hidrólisis de ésteres unidos a sustratos lipídicos insolubles en agua. Las lipasas catalizan la hidrólisis de lípidos en gliceroles y ácidos grasos.

20 “Enzima modificante de lípidos”, se refiere a una enzima que altera la estructura covalente de un lípido. Los ejemplos de enzimas de modificación de lípidos incluyen una lipasa, una acilo graso-ACP tioesterasa, una acilo graso-CoA/aldehído reductasa, una acilo graso-CoA reductasa, una aldehído graso reductasa, una desaturasa, que incluye una proteína desaturasa portadora de estearoil acilo (SAD) y una acilo graso destaurasa (FAD), y una aldehído graso decarbonilasa.

25 “Enzima de la vía de los lípidos”, es cualquier enzima que juega un papel en el metabolismo de los lípidos, es decir, en la síntesis de los lípidos, modificación, o degradación, y cualquier proteína que modifica químicamente los lípidos, así como las proteínas portadoras.

30 Los “lípidos”, son una clase de moléculas que son solubles en solventes no polares (como el éter y el cloroformo) y son relativamente o completamente insolubles en agua. Las moléculas de lípidos tienen estas propiedades porque están constituidas por largas colas de hidrocarburos que son de naturaleza hidrofóbica. Los ejemplos de lípidos incluyen los ácidos grasos (saturados e insaturados); glicéridos o glicerolípidos (como monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos o grasas neutras, y fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos); no glicéridos (esfingolípidos, esterol lípidos incluyendo colesterol y hormonas esteroideas, lípidos de prenol incluyendo terpenoides, alcoholes grasos, ceras, y poliquétidos); y derivados de lípidos complejos (lípidos unidos a azúcares, o glicolípidos, y lípidos unidos a proteínas). Las grasas son un subgrupo de lípidos denominados “triacilglicéridos”.

35 “Lisado”, es una solución que contiene el contenido de células lisadas.

40 “Lisis”, es la rotura de la membrana plasmática y opcionalmente de la pared celular de un organismo biológico suficiente para liberar al menos algún contenido intracelular, a menudo por mecanismos mecánicos, virales u osmóticos que comprometen su integridad.

45 “Lisar”, es la perturbación de la membrana celular y opcionalmente la pared celular de un organismo biológico o célula suficiente para liberar al menos algún contenido intracelular.

50 “Microalga”, es a un organismo microbiano eucariota que contiene un cloroplasto o plastidio, y opcionalmente es capaz de realizar la fotosíntesis, o un organismo microbiano procariota que es capaz de realizar la fotosíntesis. Las microalgas incluyen los fotoautótrofos obligados, que no pueden metabolizar una fuente fija de carbono en energía, como lo hacen los heterótrofos, los cuales pueden vivir únicamente a costa de una fuente fija de carbono. Las microalgas incluyen organismos unicelulares que se separan de células hermanas poco tiempo después de la división celular, tales como las *Chlamydomonas*, así como microbios, tales como, por ejemplo, *Volvox*, que es un microbio multicelular fotosintético simple de dos tipos de células diferentes. Las microalgas incluyen células tales como *Chlorella*, *Dunaliella*, y *Prototheca*. Las microalgas también incluyen otros organismos fotosintéticos microbianos que exhiben adhesión célula-célula, tales como *Agmenellum*, *Anabaena* y *Pyrobotrys*. Las microalgas también incluyen microorganismos heterótrofos obligados que perdieron la capacidad de realizar la fotosíntesis, como ciertas especies de algas dinoflageladas y especies del género *Prototheca*.

55 “Microorganismo” y “microbio”, son organismos microscópicos unicelulares.

60 “Co-expresados naturalmente”, en referencia a dos proteínas o genes significa que las proteínas o sus genes se co-expresan de forma natural en un tejido u organismo del que se derivan, por ejemplo, porque los genes que codifican a las dos proteínas están bajo el control de una secuencia reguladora común o porque ellas se expresan en respuesta al mismo estímulo.

65 “Choque osmótico”, es la ruptura de las células en una solución después de una reducción repentina de la presión osmótica. El choque osmótico se induce a veces para liberar los componentes celulares de estas células a una solución.

“Enzima de degradación de los polisacáridos”, es cualquier enzima capaz de catalizar la hidrólisis o sacarificación, de cualquier polisacárido. Por ejemplo, las celulasas catalizan la hidrólisis de celulosa.

5 “Polisacáridos” o “glicanos”, son los carbohidratos hechos de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. La celulosa es un polisacárido que forma parte de ciertas paredes celulares de las plantas. La celulosa puede ser despolimerizada por enzimas para producir monosacáridos como la glucosa y la xilosa, así como disacáridos más grandes y oligosacáridos.

10 “Promotor”, es una secuencia control de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en la presente descripción, un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de polimerasa tipo II, un elemento TATA. Un promotor incluye opcionalmente también los elementos potenciadores o represores distales, que se pueden localizar hasta diversos miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción.

15 “Recombinante”, es una célula, ácido nucleico, proteína o vector, que se modificó debido a la introducción de un ácido nucleico exógeno o la alteración de un ácido nucleico nativo. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en las células nativas (no recombinantes) o expresan genes nativos de manera diferente a como estos genes son expresados por una célula no recombinante. Un “ácido nucleico recombinante” es un ácido nucleico formado originalmente in vitro, en general, por la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, o de otra manera están en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden producir, por ejemplo, para colocar dos o más ácidos nucleicos en unión operativa. Así, un ácido nucleico aislado o un vector de expresión formado in vitro por la ligadura de moléculas de ADN que normalmente no se unen en la naturaleza, se consideran recombinantes para los propósitos de la presente invención. Una vez que se obtiene un ácido nucleico recombinante y se introduce en una célula o en un organismo huésped, este se puede replicar usando la maquinaria celular in vivo de la célula huésped; sin embargo, estos ácidos nucleicos, una vez producidos por métodos recombinantes, aunque posteriormente se repliquen intracelularmente, siguen considerándose recombinantes para los propósitos de la esta invención. Del mismo modo, una “proteína recombinante” es una proteína producida usando técnicas de recombinación, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante.

“Diesel renovable”, es una mezcla de alcanos (como C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 y C18:0) producidos mediante la hidrogenación y desoxigenación de los lípidos.

35 “Sacarificación” es un proceso para convertir biomasa, usualmente biomasa celulósica o lignocelulósica, en azúcares monoméricos, tales como glucosa y xilosa. Material celulósico o biomasa “sacarificado” o “despolimerizado” se refiere al material celulósico o biomasa que se convierte en azúcares monoméricos a través de la sacarificación.

40 El término “similar”, cuando se usa en el contexto de una comparación con un aceite de origen natural, sin cualificación posterior, significa que el aceite que se compara con el aceite de origen natural contiene aproximadamente +/- 15%, o +/- 10% de los dos triglicéridos superiores del aceite de origen natural. Por ejemplo, la manteca de karité (el aceite de *B. Parkii*) contiene 41.2-56.8% C18:0 y 34.0-46.9% C18:1 como los dos componentes triglicéridos más comunes (ver Tabla 5). Un aceite “similar” que está dentro de +/- 10% puede contener de aproximadamente 37% a aproximadamente 62% C18:0 y de 31% a aproximadamente 52% C18:1 como los dos componentes triglicéridos más comunes. Cuando se usa en este contexto, el término “similar” incluye +/- 9%, +/- 8%, +/- 7%, +/- 6%, +/- 5%, +/- 4%, +/- 3%, +/- 2%, o +/- 1%, y puede representar además una comparación con los tres o cuatro triglicéridos superiores del aceite de origen natural, o dos fuera de los tres triglicéridos superiores, o tres fuera de los cuatro triglicéridos superiores.

50 “Sonicación”, es el proceso de ruptura de materiales biológicos, tales como una célula, mediante el uso de la energía de las ondas de sonido.

55 “Especies de furfural”, es 2-furancarboxaldehído o un derivado que conserva las mismas características estructurales básicas.

“Rastrojo”, son los tallos y hojas secas de un cultivo que quedan después de que el grano se cosecha.

60 “Gen de utilización de la sacarosa”, es un gen que, cuando se expresa, ayuda a la capacidad de una célula para utilizar la sacarosa como fuente de energía. Las proteínas codificadas por un gen de utilización de la sacarosa se refieren en la presente como “enzimas de utilización de la sacarosa” e incluyen los transportadores de sacarosa, sacarosa invertasas, y hexoquinasas como las glucoquinasas y las fructoquinasas.

## II. CULTIVO

65

La presente divulgación se refiere generalmente al cultivo de microorganismos (*por ejemplo*, microalgas, levadura oleaginosas, hongos, y bacterias), particularmente cepas de microalgas recombinantes, que incluyen cepas de *Prototheca*, para la producción de lípidos. Por conveniencia para el lector, esta sección se subdivide en subsecciones. La Subsección 1 describe las especies y cepas de *Prototheca* y cómo identificar nuevas especies y cepas de *Prototheca* y microalgas relacionadas por comparación del ADN genómico, así como otros microorganismos. La Subsección 2 describe los biorreactores útiles para el cultivo. La Subsección 3 describe los medios de cultivo. La Subsección 4 describe la producción de aceite de acuerdo con los métodos de cultivo ilustrativos de la invención. Estas descripciones son además más generalmente aplicables a otros microorganismos.

## 1. Especies y cepas de *Prototheca* y otros microorganismos

*Prototheca* es un microorganismo notable para usar en la producción de lípidos, debido a que puede producir elevados niveles de lípidos, particularmente los lípidos adecuados para la producción de combustible. Los lípidos producidos por *Prototheca* tienen cadenas de hidrocarburos de menor longitud y un mayor grado de saturación que los producidos por otras microalgas. Además, los lípidos de *Prototheca* están generalmente libres de pigmentos (niveles bajos a indetectables de clorofila y ciertos carotenoides) y en todo caso contienen mucho menos pigmentos que lípidos de otras microalgas. Además, las células de *Prototheca* recombinantes proporcionadas por la invención se pueden usar para producir lípidos con mayor rendimiento y eficiencia, y a un costo reducido, en relación con la producción de lípidos a partir de otros microorganismos. Las cepas ilustrativas de *Prototheca* para su uso en los métodos de la invención incluyen *Prototheca moriformis*, *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora* o *Prototheca zopfii*. Además, estas microalgas crecen heterotróficamente y pueden ser modificadas mediante ingeniería genética como *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca stagnora* (incluyendo UTEX 327), *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis* (incluyendo cepas de UTEX 1441, 1435), y *Prototheca zopfii*. Las especies del género *Prototheca* son heterótrofas obligadas.

Las especies de *Prototheca* para usar en la invención pueden identificarse por la amplificación de ciertas regiones objetivo del genoma. Por ejemplo, la identificación de una especie o variedad específica de *Prototheca* puede lograrse por amplificación y secuenciación de ADN nuclear y/o de cloroplastos usando cebadores y metodología que usa cualquier región del genoma, por ejemplo, usando los métodos descritos en Wu y otros, *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2001) 42:115-121. Identificación de *Chlorella spp.* isolates using ribosomal DNA sequences. Los métodos bien establecidos para el análisis filogenético, tales como la amplificación y secuenciación del espaciador transcrito interno ribosomal (ITS1 y ITS2 ADNr), ARNr 23S, ARNr 18S, y otras regiones conservadas del genoma, se pueden usar por aquellos expertos en la materia para identificar especies no solo de *Prototheca* sino también otros organismos productores de lípidos e hidrocarburos con perfiles lipídicos y capacidad de producción similares. Para ejemplos de métodos de identificación y clasificación de algas ver además, por ejemplo, *Genetics*, agosto de 2005; 170(4): 1601-10 y *RNA*, abril de 2005; 11(4):361-4.

De esta manera, la comparación del ADN genómico puede emplearse para identificar especies adecuadas de microalgas que se usan en la presente invención. Las regiones de ADN genómico conservadas, tales como pero sin limitarse al ADN que codifica para ARNr 23S, se puede amplificar a partir de especies de microalgas y comparar con secuencias consenso para seleccionar especies de microalgas que estén taxonómicamente relacionadas con las microalgas preferidas usadas en la presente invención. Abajo se muestran los ejemplos de la comparación de las secuencias de ADN para especies del género *Prototheca*. La comparación del ADN genómico también puede ser útil para identificar especies de microalgas que han sido mal identificadas en una colección de cepas. A menudo, una colección de cepas identificará especies de microalgas en base a sus características fenotípicas y morfológicas. El uso de estas características puede conllevar a la categorización incorrecta de la especie o del género de una microalga. El uso de la comparación del ADN genómico puede ser un mejor método de categorización de especies de microalgas basado en su relación filogenética.

Las microalgas para usar en la presente invención tienen, típicamente, secuencias de ADN genómico que codifican para ARNr 23S con al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, o al menos 85% de identidad de nucleótidos con al menos una de las secuencias enumeradas en las sec. con núm. de ident.: 11-19.

Para la comparación de secuencia para determinar el porcentaje de identidad nucleotídica o de aminoácidos, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, contra la cual se comparan las secuencias que se prueban. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, si es necesario se designan coordenadas posteriores, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba(s) con relación a la secuencia de referencia, basado en los parámetros de programa designados.

La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede realizarse, *por ejemplo*, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación por homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), por la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos

algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA del paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase generalmente Ausubel y otros, *supra*).

Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, el cual se describe en Altschul y otros, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El software para ejecutar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (en el sitio web [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Este algoritmo implica, en primer lugar, identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, las cuales combinan o satisfacen alguna puntuación umbral mayor que el parámetro T, cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. El parámetro T se refiere como el umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul y otros, *supra*). Los aciertos de las palabras vecinas se comportan como semillas para iniciar las búsquedas y encontrar HSP más largos que las contengan. Después, los aciertos de las palabras vecinas se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta que se incremente la puntuación de alineamiento acumulativa. Para las secuencias nucleotídicas, las puntuaciones de alineamiento acumulativas se calculan usando los parámetros M (puntuación recompensa para un par de residuos que combinan; siempre > 0) y N (puntuación castigo para residuos que no combinan; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, la puntuación acumulativa se calcula usando una matriz de puntuación. Las extensiones de los aciertos de las palabras vecinas en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en una cantidad X desde su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulativa va a cero o por debajo de cero debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Para identificar si el ácido nucleico o el polipéptido está dentro del alcance de la invención se adecúan los parámetros definidos en los programas BLAST. El programa BLASTN (para las secuencias nucleotídicas) usa como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62. El programa TBLASTN (que usando secuencias de proteínas para secuenciar nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y una matriz de puntuación BLOSUM 62. (ver Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl Acad Sci., USA* 89:10915 (1989)).

Además de calcular el porcentaje de identidad de la secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, *por ejemplo*, Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad Sci., USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con que dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos coincidan al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación entre el ácido nucleico del ensayo y uno de referencia es menor de aproximadamente 0.1, con más preferencia si es menor de aproximadamente 0.01 y con mayor preferencia si es menor de aproximadamente 0.001.

Otras consideraciones que afectan la selección de los microorganismos para su uso en la invención, además de la producción de lípidos o hidrocarburos adecuados para la producción de aceites, combustibles y oleoquímicos, son: (1) alto contenido de lípidos como un porcentaje del peso celular; (2) facilidad de crecimiento; (3) facilidad de modificación genética; y (4) facilidad de procesamiento de la biomasa. En realizaciones particulares, el microorganismo salvaje o modificado mediante ingeniería genética produce células que contienen al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, o al menos 70% o más de lípidos. Los organismos preferidos crecen heterotróficamente (en azúcar en ausencia de luz).

Los ejemplos de algas que pueden usarse para practicar la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, las siguientes algas enumeradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de algas.

<i>Prototheca wickerhamii</i> , <i>Prototheca stagnora</i> , <i>Prototheca portoricensis</i> , <i>Prototheca moriformis</i> , <i>Prototheca zopfii</i>
--

## 2. Biorreactor

Los microorganismos se cultivan con dos propósitos, el de realizar manipulaciones genéticas y para la producción de hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos). El primer tipo de cultivo se realiza a pequeña escala e inicialmente, al menos, bajo condiciones en las que el microorganismo inicial pueda crecer. El cultivo para los propósitos de producción de hidrocarburo se realiza usualmente a gran escala (por ejemplo, biorreactores de 10,000 l, 40,000 l, 100,000 l o mayores) en un biorreactor. Las microalgas, que incluyen especies de *Prototheca* se cultivan típicamente en los métodos de la invención en medio líquido dentro de un biorreactor. Típicamente, el biorreactor no permite la entrada de la luz.

El biorreactor o fermentador se usa para cultivar células microbianas oleaginosas, preferentemente células de microalgas a través de varias fases de su ciclo fisiológico. Los biorreactores ofrecen muchas ventajas para su uso

en métodos de crecimiento y propagación heterotrófica. Para producir biomasa para su uso en alimentos, las microalgas se fermentan preferiblemente en grandes cantidades de líquido, tales como cultivos en suspensión como se muestra en un ejemplo. Los biorreactores tales como los fermentadores de acero pueden alojar volúmenes muy grandes de cultivo (se usan biorreactores de 40,000 litros y más de capacidad en varias realizaciones de la invención). Los biorreactores típicamente permiten, además, el control de las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH, tensión de oxígeno, y niveles de dióxido de carbono. Por ejemplo, los biorreactores se configuran típicamente, por ejemplo usando puertos unidos a tuberías, para permitir que los componentes gaseosos como el oxígeno o el nitrógeno sean burbujeados a través del líquido de cultivo. Otros parámetros del cultivo, tales como el pH del medio de cultivo, la identidad y concentración de los oligoelementos, y otros constituyentes del medio, se pueden manipular fácilmente usando el biorreactor.

Los biorreactores se pueden configurar para que el medio de cultivo fluya a través del biorreactor durante todo el período de tiempo en que las microalgas se reproducen e incrementan su número. En algunas realizaciones, por ejemplo, el medio puede ser infundido dentro del biorreactor después de la inoculación, pero antes que las células alcancen la densidad deseada. En otros casos, el biorreactor se llena con el medio de cultivo al inicio de un cultivo, y no se infunde más medio de cultivo después que el cultivo es inoculado. En otras palabras, la biomasa de microalgas se cultiva en un medio acuoso durante un período de tiempo en el que las microalgas se reproducen e incrementan su número; sin embargo, durante este período de tiempo las cantidades del medio de cultivo acuoso no fluyen a través del biorreactor. Así, en algunas realizaciones el medio de cultivo acuoso no fluye a través del biorreactor después de la inoculación.

Los biorreactores equipados con dispositivos tales como aspas de agitación e impulsores, mecanismos de balanceo, barras de agitación, medios para infundir gas presurizado, pueden ser usados para mezclar los cultivos de microalgas. La mezcla puede ser continua o intermitente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un régimen de flujo turbulento de entrada de gas y entrada del medio no se mantiene para la reproducción de las microalgas hasta que se haya alcanzado el incremento deseado en número de dichas microalgas.

Los puertos de los biorreactores se pueden usar para introducir, o extraer gases, sólidos, semisólidos y líquidos de la cámara del reactor que contiene las microalgas. Aunque muchos biorreactores tienen más de un puerto (por ejemplo, uno para la entrada del medio y otro para el muestreo), no es necesario que solamente una sustancia entre o salga por el puerto. Por ejemplo, un puerto se puede usar para hacer fluir el medio de cultivo dentro del reactor y posteriormente para el muestreo, entrada de gas, salida de gas, u otros propósitos. Preferiblemente, un puerto de muestreo se puede usar repetidamente sin que se altere de forma comprometedoramente la naturaleza axénica del cultivo. Un puerto de muestreo puede configurarse con una válvula u otro dispositivo que permita detener o iniciar la circulación de la muestra o proporcionar un medio de muestreo continuo. Típicamente, los biorreactores tienen al menos un puerto que permite la inoculación de un cultivo y dicho puerto puede usarse, además, con otros fines tales como la entrada de medio o gas.

Los puertos de los biorreactores permiten manipular el contenido gaseoso de los cultivos de microalgas. Para ilustrar, parte del volumen de un biorreactor puede ser gas en lugar de líquido, y las entradas de gas del biorreactor permiten el bombeo de gases hacia dentro del biorreactor. Los gases que se pueden bombear beneficiosamente dentro de un biorreactor incluyen aire, mezclas de aire/CO<sub>2</sub>, gases nobles, tales como argón y otros gases. Los biorreactores están típicamente equipados para permitir que el usuario controle la velocidad de entrada del gas en el biorreactor. Como se denotó anteriormente, al aumentar el flujo de gas dentro del biorreactor aumenta la mezcla del cultivo.

El incremento del flujo gaseoso afecta también la turbidez del cultivo. La turbulencia se puede lograr colocando un puerto de entrada de gas debajo del nivel del medio de cultivo acuoso, de manera tal que el gas que entre al biorreactor burbujee hacia la superficie del cultivo. Uno o mas puertos de salida de gas permiten que el gas escape, impidiendo de este modo que la presión aumente gradualmente en el biorreactor. Preferiblemente, el puerto de salida de gas conduce hacia una válvula "en una sola dirección" que impide que microorganismos contaminantes entren al biorreactor.

### 3. Medio

El medio de cultivo de microalgas está compuesto de manera general por una fuente fija de nitrógeno, una fuente fija de carbono, oligoelementos, de forma opcional una solución amortiguadora para mantener el pH, y fosfato (típicamente proporcionado en forma de sal de fosfato). Otros componentes pueden incluir sales tales como cloruro de sodio, particularmente para microalgas marinas. Las fuentes de nitrógeno incluyen fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, incluyendo, por ejemplo, sin limitación, nitrógeno molecular, nitrato, sales de nitrato, amoníaco (puro o en forma de sal, como (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y NH<sub>4</sub>OH), proteínas, harina de soya, licor de maíz empinada, y extracto de levadura. Los ejemplos de oligoelementos incluyen zinc, boro, cobalto, cobre, manganeso, y molibdeno en, por ejemplo, las formas respectivas de ZnCl<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O y (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O.

De acuerdo con los métodos de la presente invención los microorganismos útiles se encuentran en varias

lugares y ambientes a través del mundo. Como consecuencia de su aislamiento de otras especies y su divergencia evolutiva resultante, el medio de crecimiento particular para un crecimiento óptimo y generación de constituyentes de lípidos y/o hidrocarburos puede ser difícil de predecir. En algunos casos, ciertas cepas de microorganismos pueden ser incapaces de crecer en un medio particular de crecimiento debido a la presencia de algún componente inhibitorio o a la ausencia de un requerimiento nutricional esencial necesario por una cepa particular del microorganismo.

Los medios de crecimiento sólidos y líquidos generalmente están disponibles de una amplia variedad de fuentes, y las instrucciones para la preparación de un medio en particular que sea adecuado para una amplia gama de variedades de microorganismos, pueden encontrarse, por ejemplo, en el sitio web <http://www.utex.org/>, un sitio mantenido por la Universidad de Texas en Austin, 1 University Station A6700, Austin, Texas, 78712-0183, para su colección de cultivo de algas (UTEX). Por ejemplo, varios medios de agua dulce y agua salada incluyen los descritos en la publicación PCT núm. 2008/151149, incorporada en la presente como referencia.

En un ejemplo particular, el medio Proteosa es adecuado para cultivos axénicos, y un volumen de 1l del medio (pH~6.8) puede prepararse por adición de 1g de proteosa peptona a 1 litro de Medio Bristol. El medio Bristol comprende 2.94 mM de  $\text{NaNO}_3$ , 0.17 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 mM de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.43 mM, 1.29 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y 1.43 mM de  $\text{NaCl}$  en una solución acuosa. Para 1.5% de medio agar, se pueden adicionar 15 g de agar a 1 l de la solución. La solución se cubre y se somete a autoclave, y después se almacena a temperatura refrigerada antes del uso. Otro ejemplo es el medio de aislamiento de *Prototheca* (PIM), que comprende 10g/l de hidrógeno ftalato de potasio (KHP), 0.9g/l de hidróxido de sodio, 0.1g/l de sulfato de magnesio, 0.2g/l de hidrógeno fosfato de potasio, 0.3g/l de cloruro de amonio, 10g/l de glucosa, 0.001g/l de hidrocloreuro de tiamina, 20g/l de agar, 0.25g/l de 5-fluorocitosina, en un intervalo de pH de 5.0 a 5.2 (véase Pore, 1973, App. Microbiology, 26: 648-649). Otros medios adecuados para usar con los métodos de la invención se pueden identificar fácilmente mediante la consulta de la URL identificada anteriormente, o mediante la consulta de otras organizaciones que mantienen cultivos de microorganismos, tales como SAG, CCAP o CCALA. SAG se refiere a la Colección de Cultivos de Algas en la Universidad de Göttingen (Göttingen, Alemania), CCAP se refiere a la colección de cultivos de algas y protozoos gestionado por la Asociación Escocesa de Ciencias Marinas (Escocia, Reino Unido), y CCALA se refiere a la colección de cultivos de algas de laboratorio en el Instituto de Botánica (Třeboň, República Checa). Adicionalmente, la patente de Estados Unidos núm. 5,900,370 describe formulaciones de medios y condiciones adecuadas para la fermentación heterótrofa de las especies de *Prototheca*.

Para la producción de aceite, es importante a la selección de una fuente fija de carbono, ya que el costo de la fuente fija de carbono debe ser lo suficientemente bajo para que la producción de aceite resulte económica. Así, aunque las fuentes de carbono adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato, floridosida, fructosa, galactosa, ácido glucurónico, glucosa, glicerol, lactosa, manosa, N-acetilglucosamina, ramnosa, sacarosa, y/o xilosa, la selección de materias primas que contengan dichos compuestos es un aspecto importante de los métodos de la invención. Las materias primas adecuadas, útiles de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, licor negro, almidón de maíz, material celulósico despolimerizado, suero de leche, melaza, papa, sorgo, sacarosa, azúcar de remolacha, caña de azúcar, arroz, y trigo. Las fuentes de carbono pueden proporcionarse además como una mezcla de sacarosa y pulpa de azúcar de remolacha despolimerizada. Una o más fuentes de carbono pueden ser suministradas a una concentración de al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 100 mM, al menos aproximadamente 500 mM, al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 50 mM, y al menos aproximadamente 500 mM, de una o más fuentes fijas de carbono suministradas exógenamente. Las fuentes de carbono de particular interés para los propósitos de la presente invención incluyen celulosa (en forma despolimerizada), glicerol, sacarosa, y sorgo, cada uno éstos se discute abajo con más detalle.

De acuerdo con la presente invención, los microorganismos se pueden cultivar usando biomasa celulósica despolimerizada como una materia prima. La biomasa celulósica (por ejemplo, rastrojo como rastrojo de maíz) es barata y fácilmente disponible; sin embargo los intentos de usar este material como una materia prima para la levadura han fracasado. En particular, se ha encontrado que estas materias primas tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de la levadura, y la levadura no puede usar los azúcares de 5 carbonos producida a partir de materiales celulósicos (por ejemplo, xilosa a partir de hemicelulosa). En contraste, las microalgas pueden crecer en material celulósico procesado. Los materiales celulósicos incluyen, por lo general, aproximadamente 40-60% de celulosa, aproximadamente 20-40% de hemicelulosa; y 10-30% de lignina.

Los materiales celulósicos adecuados incluyen los residuos de cosechas energéticas herbáceas y leñosas, así como cultivos agrícolas, es decir, partes de plantas, principalmente tallos y hojas no eliminadas de los campos con el alimento principal o el producto de fibra. Los ejemplos incluyen desechos agrícolas tales como el bagazo de caña de azúcar, cascarilla de arroz, fibra de maíz (incluyendo tallos, hojas, cáscaras y mazorcas), paja del trigo, paja del arroz, pulpa del azúcar de remolacha, pulpa de cítricos, cáscaras de cítricos, desechos forestales tales como madera y entresacas de madera blanda, madera dura y blanda y desechos de las operaciones de la madera, desechos de madera tales como desechos de las fábricas (astillas de madera, aserrín) y desechos de plantas de celulosa, desechos urbanos, tales como pedazos de papel de desechos sólidos urbanos, desechos urbanos de madera y desechos urbanos verdes tales como los recortes de césped municipales y desechos de construcción de

madera. Los materiales celulósicos adicionales incluyen cosechas celulósicas dedicadas tales como pasto varilla, madera híbrida de álamo, miscantus, fibras de caña, y fibras de sorgo. Los azúcares de 5 carbonos que se producen a partir de estos materiales incluyen la xilosa.

5 Los materiales celulósicos se tratan para aumentar la eficiencia con la que el microbio puede utilizar el(los) azúcar(es) contenidos en los materiales. La invención proporciona nuevos métodos para el tratamiento de materiales  
 10 celulósicos después de la explosión con ácidos para que los materiales sean adecuados para usar en un cultivo heterótrofo de microbios (por ejemplo, microalgas y levaduras oleaginosas). Como se discutió anteriormente, la biomasa lignocelulósica está compuesta por varias fracciones, incluyendo celulosa, un polímero cristalino de enlaces  
 15 beta 1,4-glucosídicos (un azúcar de 6 carbonos), hemicelulosa, un polímero mas estrechamente asociado compuesto predominantemente de xilosa (un azúcar de 5 carbonos), y en menor cantidad manosa, galactosa, arabinosa, lignina, un polímero aromático complejo formado por alcohol sinapílico y sus derivados, y pectinas, las cuales son cadenas lineales de un ácido alfa poligalacturónico 1,4 enlazado. Debido a la estructura polimérica de la  
 20 celulosa y la hemicelulosa, los azúcares (por ejemplo, glucosa y xilosa monomérica) en ellos no se encuentran en una forma tal que se puedan usar (metabolizar) de manera eficiente por muchos microbios. Para estos microbios, el procesamiento posterior de la biomasa celulósica para generar los azúcares monoméricos que componen los  
 25 polímeros, puede ser de gran ayuda para asegurar que los materiales celulósicos se usen de manera eficiente como materia prima (fuente de carbono).

30 La biomasa celulósica o de celulosa se somete a un proceso, denominado "explosión", en el cual la biomasa se trata con ácido sulfúrico (u otro) diluido a presión y temperatura elevadas. Este proceso condiciona la biomasa de manera que se pueda someter de manera eficiente a la hidrólisis enzimática de las fracciones celulósicas y hemicelulósicas en monómeros de glucosa y xilosa. Los azúcares monoméricos que se obtienen se denominan  
 35 azúcares celulósicos. Los azúcares celulósicos pueden usarse posteriormente por los microorganismos para producir varios metabolitos (por ejemplo, lípidos). La etapa de explosión con ácido da como resultado la hidrólisis parcial de la fracción de hemicelulosa para obtener monosacáridos. Estos azúcares se liberan completamente de la biomasa mediante un tratamiento posterior. En algunas realizaciones, este tratamiento consiste en un tratamiento hidrotérmico que incluye el lavado del material explotado con agua caliente, lo cual elimina contaminantes tales  
 40 como las sales. Esta etapa no es necesaria para las fermentaciones celulósicas de etanol debido a que en esos procesos se usan concentraciones de azúcares más diluidas. En otras realizaciones, el tratamiento posterior es un tratamiento adicional con ácido. En aún otras realizaciones, el tratamiento posterior es la hidrólisis enzimática del material explotado. Estos tratamientos se pueden usar además en cualquier combinación. El tipo de tratamiento puede afectar el tipo de azúcar liberado (por ejemplo, azúcares de cinco carbonos versus azúcares de seis  
 45 carbonos) y la etapa en la cual se liberan en el proceso. Como consecuencia, se pueden crear diferentes corrientes de azúcares, que pueden ser de cinco o de seis átomos de carbono. Estas corrientes enriquecidas de cinco o seis átomos de carbono, se pueden dirigir después a los microorganismos específicos con diferentes capacidades de  
 50 utilización del carbono.

55 Los métodos de la presente invención involucran típicamente la fermentación a densidades de células más altas que lo que se alcanza en la fermentación etanólica. Debido a las altas densidades de los cultivos para la producción heterótrofa de aceite celulósico, la fuente de carbono fija (por ejemplo, la(s) corriente(s) de azúcar del derivado celulósico) está preferentemente en una forma concentrada. El nivel de glucosa del material celulósico  
 60 despolimerizado es, preferiblemente, de al menos 300 g/litro, al menos 400 g/litro, al menos 500 g/litro o al menos 600 g/litro antes de la etapa de cultivo, el cual es opcionalmente un cultivo tipo lote alimentado, en el que las células se alimentan con el material mientras crecen y acumulan lípidos. En la producción del etanol celulósico, las corrientes de azúcares celulósicos no se usan a ni cerca a estos intervalos de concentración. Así, para generar y mantener las altas densidades de la célula durante la producción del aceite lignocelulósico, la(s) materia(s) prima(s) de carbono se deben suministrar a los cultivos heterótrofos en forma muy concentrada. Sin embargo, cualquier  
 65 componente en la corriente de alimentación que no sea sustrato y que no se metabolice por el microorganismo oleaginoso se acumulará en el biorreactor, lo que conduce a problemas si el componente es tóxico o tiene actividad inhibitoria sobre la producción del producto final deseado. Aunque la lignina, y los subproductos derivados de la lignina, subproductos derivados de carbohidratos, tales como, furfurales e hidroximetilfurfurales y las sales derivadas de la generación de los materiales celulósicos (durante el proceso de explosión y el proceso de neutralización posterior), e incluso los azúcares no metabolizados pentosa/hexosa, pueden presentar problemas en las fermentaciones etanólicas, estos efectos se amplifican significativamente en los procesos en los cuales su concentración en la materia prima inicial es alta. Para lograr concentraciones de azúcar en el intervalo de 300g/l (o superior) para los azúcares de seis carbonos que se pueden usar en producciones a gran escala de los aceites lignocelulósicos descritos en la presente invención, la concentración de estos materiales tóxicos puede ser 20 veces mayor que la concentración típicamente presente en las fermentaciones etanólicas de la biomasa celulósica.

El tratamiento con el proceso de explosión del material celulósico utiliza cantidades significativas de ácido sulfúrico, calor y presión, liberando por tanto subproductos de carbohidratos específicamente furfurales e hidroximetilfurfurales. Los furfurales e hidroximetilfurfurales se producen durante la hidrólisis de la hemicelulosa mediante la deshidratación de la xilosa en furfural y agua. En algunas realizaciones de la presente invención, estos subproductos (por ejemplo, furfurales e hidroximetilfurfurales) se eliminan del material lignocelulósico sacarificado

antes de la introducción en el biorreactor. En algunas realizaciones de la presente invención, el proceso de eliminación de los subproductos de carbohidratos se realiza mediante tratamiento hidrotérmico de los materiales celulósicos explotados. Además, la presente invención proporciona métodos en los cuales las cepas capaces de tolerar compuestos tales como los furfurales e hidroximetilfurfurales se usan para la producción de aceites lignocelulósicos. En otra realización, la presente invención también proporciona métodos y microorganismos que no solo son capaces de tolerar los furfurales en el medio de fermentación, sino que son realmente capaces de metabolizar estos subproductos durante la producción del aceite lignocelulósico.

El proceso de explosión también genera niveles significativos de sales. Por ejemplo, las condiciones típicas de la explosión pueden dar como resultado conductividades superiores a los 5 mS/cm cuando la biomasa celulósica explotada se resuspende en una relación de 10:1 agua:sólidos (peso seco). En ciertas realizaciones de la presente invención, la biomasa explotada diluida se somete a sacarificación enzimática, y el sobrenadante obtenido se concentra hasta 25 veces para su uso en el biorreactor. El nivel de sal (medido por conductividad) en la(s) corriente(s) de azúcar concentrada, puede ser inaceptablemente alto (hasta 1.5 M Na<sup>+</sup> equivalentes). Las sales adicionales se generan con la neutralización de los materiales explotados para el proceso de sacarificación enzimática posterior. La presente invención proporciona métodos para eliminar estas sales de manera que la(s) corriente(s) de azúcar celulósica concentrada resultante se pueda usar en los procesos heterótrofos para producir aceite lignocelulósico. En algunas realizaciones, el método para eliminar estas sales es la desionización con resinas, tales como, pero sin limitarse a, DOWEX Marathon MR3. En ciertas realizaciones, la etapa de desionización con resina ocurre antes de la concentración del azúcar o el ajuste del pH y el tratamiento hidrotérmico de la biomasa previo a la sacarificación o cualquier combinación del procedimiento; en otras realizaciones esta etapa es llevada a cabo después de uno o más de estos procesos. En otras realizaciones, el proceso de explosión en sí se cambia para evitar la generación de sales a niveles altos inaceptables. Por ejemplo, una alternativa adecuada para la explosión de la biomasa celulósica con ácido sulfúrico (u otro ácido) es la fabricación de pasta mecánica para hacer que la biomasa celulósica sea receptiva a la hidrólisis enzimática (sacarificación). En aún otras realizaciones, se usan cepas nativas de microorganismos resistentes a niveles altos de sal o cepas modificadas mediante ingeniería genética con resistencia a niveles altos de sal.

Un ejemplo preferido para el proceso de preparar biomasa celulósica explotada para usar en la producción de aceite lignocelulósico heterótrofo usando microbios oleaginosos. Una primera etapa comprende ajustar el pH de la biomasa celulósica explotada resuspendida en el intervalo de 5.0-5.3 seguido por el lavado de la biomasa celulósica tres veces. Esta etapa de lavado se puede realizar usando una variedad de medios que incluyen el uso de resinas de desalado y de intercambio iónico, ósmosis inversa, tratamiento hidrotérmico (como el descrito anteriormente), o simplemente por re-suspensión repetida en agua desionizada y centrifugación. Esta etapa de lavado resulta en una corriente celulósica cuya conductividad se encuentra entre 100-300 µS/cm y la eliminación de cantidades significativas de furfurales e hidroximetilfurfurales. Lo decantado de esta etapa de lavado se puede guardar para concentrar los azúcares de cinco carbonos liberados de la fracción de hemicelulosa. Una segunda etapa comprende la sacarificación enzimática de la biomasa celulósica lavada. En una realización preferida se usa Accellerase (Genencor). Una tercera etapa comprende la recuperación de los azúcares mediante centrifugación o decantación y lavado de la biomasa sacarificada. La biomasa resultante (sólidos) es un componente denso energético, rico en lignina que puede usarse como combustible o eliminar como desecho. La corriente de azúcar recuperada durante el proceso de centrifugación/decantado y enjuague se recoge. Una cuarta etapa comprende la microfiltración para eliminar los contaminantes sólidos y recuperar el permeado. Una quinta etapa comprende una etapa de concentración que se puede realizar usando un evaporador al vacío. Esta etapa puede incluir, opcionalmente, la adición de agente antiespumantes tales como el P'2000 (Sigma/Fluka), el cual se necesita algunas veces debido al contenido proteico de la materia prima de azúcar resultante.

En los métodos de la invención, la fuente de carbono es glicerol, incluyendo los subproductos de glicerol acidulados y no acidulados obtenidos de la transesterificación del biodiesel. En una realización, la fuente de carbono incluye el glicerol y al menos otra fuente de carbono. En algunos casos, toda la glicerina y al menos otra fuente de carbono fijada se proporcionan al microorganismo al inicio de la fermentación. En algunos casos, la glicerina y la al menos una otra fuente de carbono fijada se proporcionan al microorganismo simultáneamente a una relación predeterminada. En algunos casos, el glicerol y al menos una de las otras fuentes fijas de carbono se alimentan a los microbios a una velocidad predeterminada durante el curso de la fermentación.

Algunas microalgas se someten a división celular de manera más rápida en presencia de glicerol que en presencia de glucosa (ver Pub. PCT núm. 2008/151149). En estos casos, los procesos de crecimiento en dos etapas en los que las células se alimentan primeramente con glicerol para aumentar rápidamente la densidad celular, y después se alimentan con glucosa para acumular lípidos, pueden mejorar la eficiencia con la que se producen los lípidos. El uso del subproducto de glicerol del proceso de transesterificación proporciona ventajas económicas significativas al ponerlo nuevamente en el proceso de producción. También se proporcionan otros métodos de alimentación tales como mezclas de glicerol y glucosa. La alimentación de tales mezclas proporciona, además, los mismos beneficios económicos. Además, la invención proporciona métodos para alimentar las microalgas con azúcares alternativos, tales como la sacarosa en varias combinaciones con glicerol.

En los métodos de la invención como se exponen en las reivindicaciones, la fuente de carbono es azúcar invertido. El azúcar invertido se produce por la separación de la sacarosa en sus componentes monosacáridos, fructosa y glucosa. La producción de azúcar invertido puede alcanzarse a través de varios métodos que se conocen en la técnica. Un método de este tipo es calentar una solución acuosa de sacarosa. Frecuentemente se emplean catalizadores para acelerar la conversión de sacarosa en azúcar invertido. Estos catalizadores pueden ser biológicos, por ejemplo enzimas tales como invertasas y sucrasas pueden añadirse a la sacarosa para acelerar la reacción de hidrólisis para producir azúcar invertido. El ácido es un ejemplo de catalizador no biológico, cuando se combina con calor, puede acelerar la reacción de hidrólisis. Una vez que se prepara el azúcar invertido, este es menos propenso a la cristalización comparada con la sacarosa y así, proporciona ventajas para el almacenamiento y en la fermentación por lote alimentado, el cual en el caso del cultivo heterótrofo de microbios, incluyendo las microalgas, existe una necesidad de fuente de carbono concentrado. En una realización, la fuente de carbono es azúcar invertido, preferentemente en una forma concentrada, preferentemente al menos 800g/litro, al menos 900 g/litro, al menos 1000 g/litro o al menos 1100 g/litro antes de la etapa de cultivo, la cual es opcionalmente un cultivo por lote alimentado. El azúcar invertido, preferentemente en una forma concentrada, se alimenta a las células con el tiempo mientras las células crecen y acumulan lípidos.

En los métodos de la invención como se exponen en las reivindicaciones, la fuente de carbono es sacarosa, incluyendo una materia prima compleja que contiene sacarosa, tal como el jugo espeso de la caña del procesamiento de la caña de azúcar. Debido a las densidades superiores de los cultivos para la producción heterótrofa de aceite, la fuente de carbono fija (por ejemplo, sacarosa, glucosa, etc.) está preferentemente en una forma concentrada, preferentemente al menos 500 g/litro, al menos 600 g/litro, al menos 700 g/litro o al menos 800 g/litro de la fuente de carbono fija antes de la etapa de cultivo, la cual es opcionalmente un cultivo por lote alimentado en el cual el material se alimenta a las células con el tiempo mientras las células crecen y acumulan lípidos. En algunos casos, la fuente de carbono es sacarosa en forma de jugo espeso de la caña, preferentemente en una forma concentrada, preferentemente al menos 60% de sólidos o aproximadamente 770 g/litro de azúcar, al menos 70% de sólidos o aproximadamente 925 g/litro de azúcar, o al menos 80% de sólidos o aproximadamente 1125 g/litro de azúcar antes de la etapa de cultivo, la cual es opcionalmente un cultivo por lote alimentado. El jugo espeso de la caña concentrado se alimenta a las células con el tiempo mientras las células crecen y acumulan lípidos.

En un ejemplo, el medio de cultivo incluye, además, al menos una enzima de utilización de la sacarosa. En algunos casos, el medio de cultivo incluye una sacarosa invertasa. En una realización, la enzima sacarosa invertasa es una enzima sacarosa invertasa secretable codificada por un gen de sacarosa invertasa exógeno expresado por la población de microorganismos. Así, en algunos casos, como se describe con más detalles en la Sección IV, más abajo, la microalga se modificó genéticamente para expresar una enzima de utilización de la sacarosa, tal como un transportador de sacarosa, una sacarosa invertasa, una hexoquinasa, una glucoquinasa, o una fructoquinasa.

Las materias primas complejas que contienen sacarosa incluyen a los desechos de melaza del procesamiento de la caña de azúcar; el uso de estos productos de desecho del procesamiento de la caña de azúcar de bajo valor proporciona ahorros significativos de los costos de producción de hidrocarburos y otros aceites. El sorgo es otra materia prima compleja que contiene sacarosa que es útil en los métodos de la invención, incluyendo sirope de sorgo y sorgo puro. El sirope de sorgo se produce a partir del jugo de la caña dulce de sorgo. Su perfil de azúcares se compone fundamentalmente de glucosa (dextrosa), fructosa y sacarosa.

#### 4. Producción de aceite

Para la producción de aceite de acuerdo con los métodos de la invención, se prefiere cultivar las células en la oscuridad, como es el caso, por ejemplo, cuando se usan fermentadores muy grandes (40,000 litros y de mayor capacidad) que no permiten que la luz alcance el cultivo. Las especies de *Prototheca* se cultivan y propagan para la producción de aceite en un medio que contiene una fuente de carbono fija y en ausencia de luz; tal crecimiento se conoce como crecimiento heterótrofo.

Como un ejemplo, un inóculo de células microbianas oleaginosas productoras de lípido, preferentemente células de microalgas se introducen en el medio; hay un periodo de retraso (fase de retraso) antes que las células empiecen a propagarse. Tras el periodo de latencia, la velocidad de propagación aumenta a un ritmo constante y entra en la fase log o exponencial. La fase exponencial, a su vez, es seguida por una desaceleración de la propagación debido a la disminución de nutrientes como el nitrógeno, el aumento de sustancias tóxicas, y los mecanismos de detección de quórum. Después de esta desaceleración, se detiene la propagación y las células entran en una fase estacionaria o estado constante, dependiendo del ambiente particular proporcionado a las células. Para la obtención de biomasa rica en lípidos, el cultivo típicamente se cosecha bien después del final de la fase exponencial, lo que puede terminar tempranamente al permitir que el nitrógeno u otro nutriente clave (distinto del carbono) se agote, lo que obliga a las células a convertir en lípidos las fuentes de carbono presentes en exceso. Los parámetros de las condiciones de cultivo pueden manipularse para optimizar la producción total de aceite, la combinación de especies de lípidos producidos y/o la producción de un aceite específico.

Como se mencionó anteriormente, un biorreactor o fermentador se usa para permitir que las células se sometan a las diversas fases de su ciclo de crecimiento. Como un ejemplo, se puede introducir un inóculo de las células productoras de lípidos en un medio, seguido por un período de latencia (fase lag) antes que las células comiencen a crecer. Tras el período de latencia, la velocidad de crecimiento aumenta constantemente y entra en la fase log o exponencial. La fase exponencial, a su vez, es seguida por una desaceleración del crecimiento debido a la disminución de nutrientes y/o el aumento de sustancias tóxicas. Después de esta desaceleración, el crecimiento se detiene, y las células entran en una fase estacionaria o estado constante, dependiendo del ambiente particular proporcionado a las células. La producción de lípidos por las células descrita en la presente puede ocurrir durante la fase exponencial o posteriormente, incluyendo la fase estacionaria en donde los nutrientes se suministran, o todavía están disponibles, para permitir la continuación de la producción de lípidos en ausencia de división celular.

Preferiblemente, los microorganismos que crecen usando las condiciones descritas en la presente y que se conocen en la materia, comprenden al menos aproximadamente 20% en peso de lípidos, preferiblemente al menos aproximadamente 40% en peso, con mayor preferencia al menos aproximadamente 50% en peso, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 60% en peso. Las condiciones del proceso se pueden ajustar para aumentar el rendimiento de los lípidos adecuados para un uso particular y/o para reducir los costos de producción. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una microalga se cultiva en presencia de una concentración limitante de uno o más nutrientes, como por ejemplo, nitrógeno, fósforo o azufre, mientras que se proporciona un exceso de energía fija de carbono como la glucosa. La limitación del nitrógeno tiende a aumentar el rendimiento de lípidos microbianos, por encima del rendimiento de lípidos microbianos en un cultivo en el que el nitrógeno se suministra en exceso. En realizaciones particulares, el aumento del rendimiento de lípidos es al menos aproximadamente: 10%, 50%, 100%, 200%, o 500%. El microbio puede cultivarse en presencia de una cantidad limitante de un nutriente para una porción del período total de cultivo o para el período completo. En realizaciones particulares, la concentración de nutrientes se mueve entre una concentración limitante y una concentración no limitante, al menos dos veces durante el período total de cultivo. El contenido de lípidos de las células se puede aumentar al continuar el cultivo por períodos de tiempo mayores, mientras que se proporcione un exceso de carbono, limitando o no el nitrógeno.

En otra realización, el rendimiento en la producción de lípidos se incrementa al cultivar un microorganismo productor de lípidos (por ejemplo, microalgas) en presencia de uno o más cofactores de una enzima de la vía metabólica de los lípidos (por ejemplo, una enzima para la síntesis de ácidos grasos). En general, la concentración del(de los) cofactor(es) es suficiente para aumentar el rendimiento de lípidos microbianos (por ejemplo, ácidos grasos) por encima del rendimiento de lípidos microbianos en ausencia del (de los) cofactor(es). En una realización particular, el(los) cofactor(es) se proporcionan al cultivo mediante la inclusión de un microbio en el cultivo (por ejemplo, microalgas) que contiene un gen exógeno que codifica para el(los) cofactor(es). Como alternativa, el(los) cofactor(es) se pueden proporcionar a un cultivo mediante la inclusión de un microbio (por ejemplo, microalgas) que contiene un gen exógeno que codifica para una proteína que participa en la síntesis del cofactor. En ciertas realizaciones, los cofactores adecuados incluyen cualquier vitamina requerida por una enzima de la vía de los lípidos, tales como, por ejemplo: biotina, pantotenato. Los genes que codifican para los cofactores adecuados para su uso en la invención o que participan en la síntesis de tales cofactores son bien conocidos y se pueden introducir en los microbios (por ejemplo, microalgas), usando construcciones y técnicas como las descritas anteriormente.

Los ejemplos específicos de biorreactores, condiciones de cultivo, y métodos de crecimiento y propagación heterótrofa descritos en la presente, se pueden combinar de manera adecuada para mejorar la eficiencia del crecimiento microbiano y la producción de lípidos y/o proteínas.

La biomasa de microalgas con un alto porcentaje de aceites/lípidos acumulados por peso seco se genera usando diferentes métodos de cultivo, que se conocen en la materia (ver la Pub. PCT núm. 2008/151149). La biomasa de microalgas generada por los métodos de cultivo descritos en la presente y útiles de conformidad con la presente invención, comprende al menos 10% de aceite de microalgas por peso seco. En algunas realizaciones, la biomasa de microalgas comprende al menos 25%, al menos 50%, al menos 55%, o al menos 60% de aceite de microalgas por peso seco. En algunas realizaciones, la biomasa de microalgas contiene de 10-90% de aceite de microalgas, de 25-75% de aceite de microalgas, de 40-75% de aceite de microalgas, o de 50-70% de aceite de microalgas por peso seco.

El aceite de microalgas de la biomasa descrita en la presente, o extraída de la biomasa para su uso en los métodos y composiciones de la presente invención, puede comprender glicerolípidos con una o más cadenas laterales de ácidos grasos esterificados distintos. Los glicerolípidos comprenden una molécula de glicerol esterificado para uno, dos o tres moléculas de ácidos grasos, que pueden ser de diferentes longitudes y tener diferentes grados de saturación. Las características de la longitud y la saturación de las moléculas de ácidos grasos (y los aceites de microalgas) pueden manipularse para modificar las propiedades o proporciones de las moléculas de ácidos grasos en los aceites de microalgas de la presente invención, a través de las condiciones de cultivo o por vía de la ingeniería genética de los lípidos, como se describe con más detalle a continuación en la Sección IV. Por lo tanto, se pueden preparar mezclas específicas de aceite de algas de una sola especie de algas, por mezcla de la biomasa o aceite de algas a partir de dos o más especies de microalgas, o por una mezcla de aceite de algas de la invención con aceites de otras fuentes tales como soya, colza, canola, palma, almendra de palma, coco, maíz,

residuos vegetales, sebo de China, oliva, girasol, semilla de algodón, grasa de pollo, sebo de vacuno, sebo porcino, microalgas, macroalgas, microbios, cufea, lino, cacahuete, grasa blanca selecta, manteca de cerdo, Camelina sativa, semillas de mostaza, nuez de anacardo, avena, lupino, kenaf, caléndula, cáñamo, café, linaza (lino), avellana, euforbia, semillas de calabaza, cilantro, camelia, ajonjolí, cártamo, arroz, árbol del tung, cacao, copra, amapola del opio, semillas de ricino, nuez, jojoba, macadamia, nueces del Brasil, aguacate, petróleo, o una fracción destilada de cualquiera de los aceites anteriores.

La composición del aceite, *es decir*, las propiedades y proporciones de los ácidos grasos que constituyen a los glicerolípidos, también se puede manipular mediante la combinación de la biomasa o el aceite de al menos dos especies distintas de microalgas. En algunas realizaciones, al menos dos de las especies de microalgas distintas tienen diferentes perfiles de glicerolípidos. Las distintas especies de microalgas se pueden cultivar juntas o por separado, como se describe en la presente, de preferencia bajo condiciones heterótrofas, para generar los aceites respectivos. Las diferentes especies de microalgas pueden contener distintos porcentajes de los distintos ácidos grasos que constituyen los glicerolípidos de la célula.

Generalmente, las cepas de *Prototheca* tienen muy poco o nada de ácidos grasos con longitud de cadena C8-C14. Por ejemplo, *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), *Prototheca krugani* (UTEX 329), *Prototheca stagnora* (UTEX 1442) y *Prototheca zopfii* (UTEX 1438) no contienen (o contienen cantidades indetectables) de ácidos grasos C8, entre 0-0.01% de ácidos grasos C10, entre 0.03-2.1% de ácidos grasos C12 y entre 1.0-1.7% de ácidos grasos C14.

En algunos casos, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia el sustrato de acil graso-ACP de longitudes de cadena C8 o C8-10 tiene al menos 1%, al menos 1.5%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 12%, o al menos 15% o más, ácidos grasos de longitud de cadena C8. En otros casos, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia el sustrato de acil graso-ACP de longitudes de cadena C10 tiene al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 24%, o al menos 25% o más, ácidos grasos de longitud de cadena C10. En otros casos, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia el sustrato de acil graso-ACP de longitud de cadena C12 tiene al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 34%, al menos 35% o al menos 40% o más, ácidos grasos de longitud de cadena C12. En otros casos, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia el sustrato de acil graso-ACP de longitud de cadena C14 tiene al menos 1%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 6%, al menos 7%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 30%, al menos 43%, o al menos 45% o más, ácidos grasos de longitud de cadena C14.

En ejemplos no limitantes, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia el sustrato de acil graso-ACP de longitud de cadena C8 tiene entre 1%-25%, o entre 1%-15%, preferentemente 1.8-12.29%, de ácidos grasos de longitud de cadena C8. En otros ejemplos no limitantes, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia el sustrato de acil C10 graso-ACP de longitud de cadena C10 tiene entre 1%-50%, o entre 1%-25%, preferentemente 1.91-23.97% de ácidos grasos de longitud de cadena C10. En otros ejemplos no limitantes, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia el sustrato de acil graso-ACP de longitud de cadena C12 tiene entre 5%-50%, o entre 10%-40%, preferentemente 13.55-34.01%, de ácidos grasos de longitud de cadena C12. En otros ejemplos no limitantes, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia el sustrato de acil graso-ACP de longitud de cadena C14 tiene entre 1%-60%, o entre 2%-45%, preferentemente 2.59-43.27 %, de ácidos grasos de longitud de cadena C14. En otros ejemplos no limitantes, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene una amplia especificidad hacia los sustratos de la acil graso-ACP de longitud de cadena de carbono variable tiene hasta 30%, hasta 35%, o preferentemente hasta 39.45% de ácidos grasos de longitud de cadena C16. En algunos casos, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia el sustrato de acil graso-ACP de longitudes de cadena entre C8 y C14 tienen entre 1%-75%, o entre 2%-60%, preferentemente 2.69- 57.98%, de ácidos grasos de cadena media (C8-C14). En algunos casos, las cepas de *Prototheca* que contienen un transgen que codifica una acil graso-ACP tioesterasa que tiene actividad hacia los sustratos de la acil graso-ACP de longitudes de cadena entre C12 y C14 tienen al menos 30%, al menos 40%, o al menos 49% de ácidos grasos C12-C14. En algunos casos, mantener las cepas de *Prototheca* transgénicas bajo presión selectiva constante y elevada para conservar los genes exógenos, es ventajoso para aumentar los ácidos grasos deseados de una longitud de cadena específica. Los altos niveles de retención del gen exógeno también se pueden lograr mediante la inserción de genes exógenos en los cromosomas nucleares de las células usando la recombinación homóloga de vectores y los métodos descritos en la presente. Las células recombinantes que contienen genes exógenos integrados a los cromosomas nucleares son un objeto de la invención.

El aceite de microalgas también puede incluir otros componentes producidos por las microalgas, o

incorporados en el aceite de microalgas del medio de cultivo. Estos otros constituyentes pueden estar presentes en mayor o menor cantidad dependiendo de las condiciones del cultivo usado para cultivar las microalgas, las especies de microalgas, el método de extracción usado para recuperar el aceite de microalgas a partir de la biomasa y otros factores que pueden afectar la composición del aceite de microalgas. Los ejemplos no limitantes de estos constituyentes incluyen carotenoides, presentes de 0.01-0.5 mcg/g, 0.025-0.3 mcg/g, preferentemente 0.05 a 0.244 microgramos/gramo, de aceite; clorofila A presente de 0.01-0.5 mcg/g, 0.025-0.3 mcg/g, preferentemente 0.045 a 0.268 microgramos/gramo, de aceite; clorofila total de menos que 0.1 mcg/g, menos que 0.05 mcg/g, preferentemente menos que 0.025 microgramos/gramo, de aceite; gamma tocoferol presente de 1-300 mcg/g, 35-175 mcg/g, preferentemente 38.3-164 microgramos/gramo, de aceite; tocoferoles totales presentes de 10-500 mcg/g, 50-300 mcg/g, preferentemente 60.8 a 261.7 microgramo/gramo, de aceite; menos que 1%, menos que 0.5%, preferentemente menos que 0.25% brassicasterol, campesterol, estigmasterol, o betasitosterol; tocotrienoles total menos que 400 mcg/g, preferentemente menos que 300 microgramos/gramo, de aceite; o tocotrienoles totales presentes de 100-500 mcg/g, 225-350 mcg/g, preferentemente 249.6 a 325.3 microgramos/gramo, de aceite.

Los otros componentes pueden incluir, sin limitación, fosfolípidos, tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides (*por ejemplo*, alfa-caroteno, beta-caroteno, licopeno, etc), xantófilas (*por ejemplo*, luteína, zeaxantina, alfa-criptoxantina y beta-criptoxantina), y varios compuestos orgánicos o inorgánicos. En algunos casos, el aceite extraído de especies de *Prototheca* comprende entre 0.001-0.01 mcg/g, 0.0025-0.05 mcg/g, preferentemente 0.003 a 0.039 microgramo de luteína/gramo, de aceite, menos que 0.01 mcg/g, menos que 0.005 mcg/g, preferentemente menos que 0.003 microgramos de licopeno/gramo, de aceite; y menos que 0.01 mcg/g, menos que 0.005 mcg/g, preferentemente menos que 0.003 microgramo de beta caroteno/gramo, de aceite.

En algunos ejemplos, la presente invención proporciona una célula microbiana oleaginosa que comprende un aceite triglicérido, en donde el perfil de ácido graso del aceite triglicérido se selecciona del grupo que consiste de: al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 7%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 15%, C8:0; al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, o al menos aproximadamente 30%, C10:0; al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80%, C12:0; al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, o al menos aproximadamente 50%, C14:0; al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, C16:0; al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, o al menos aproximadamente 50%, C18:0; al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, C18:1; menos que aproximadamente 7%, menos que aproximadamente 5%, menos que aproximadamente 3%, menos que aproximadamente 1%, o aproximadamente 0%, C18:2; y al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, de ácidos grasos saturados.

En algunos ejemplos, la célula microbiana oleaginosa comprende aceite triglicérido, que comprende un perfil de ácido graso seleccionado del grupo que consiste de: cantidades combinadas totales de C8:0 y C10:0 de al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%; cantidades combinadas totales de C10:0, C12:0, y C14:0 de al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%; cantidades combinadas totales de C16:0, C18:0 y C18:1 de al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%; cantidades combinadas totales de C18:0, C18:1 y C18:2 de al

menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%; cantidades combinadas totales de C14:0, C16:0, C18:0 y C18:1 de al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70s%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%; y cantidades combinadas totales de C18:1 y C18:2 de menos que aproximadamente 30%, menos que aproximadamente 25%, menos que aproximadamente 20%, menos que aproximadamente 15%, menos que aproximadamente 10%, menos que aproximadamente 5%, o aproximadamente 0%.

En algunos ejemplos, la célula microbiana oleaginosa comprende aceite triglicérido con un perfil de ácido graso que comprende una relación de ácidos grasos seleccionada del grupo que consiste de: una relación C8:0 a C10:0 de al menos aproximadamente 5 a 1, al menos 6 a 1, al menos 7 a 1, al menos 8 a 1, al menos 9 a 1, o al menos 10 a 1; una relación C10:0 a C12:0 de al menos aproximadamente 6 a 1, al menos 7 a 1, al menos 8 a 1, al menos 9 a 1, o al menos 10 a 1; una relación C12:0 a C14:0 de al menos aproximadamente 5 a 1, al menos 6 a 1, al menos 7 a 1, al menos 8 a 1, al menos 9 a 1, o al menos 10 a 1; una relación C14:0 a C12:0 de al menos 7 a 1, al menos 8 a 1, al menos 9 a 1, o al menos 10 a 1; y una relación C14:0 a C16:0 de al menos 1 a 2, al menos 1 a 3, al menos 1 a 4, al menos 1 a 5, al menos 1 a 6, al menos 1 a 7, al menos 1 a 8, al menos 1 a 9, o al menos 1 a 10.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir una composición de aceite triglicérido microbiana oleaginosa con un perfil de ácido graso seleccionado del grupo que consiste de: al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 7%, al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 15%, C8:0; al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, o al menos aproximadamente 30%, C10:0; al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80%, C12:0; al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, o al menos aproximadamente 50%, C14:0; al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, C16:0; al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, o al menos aproximadamente 50% C18:0; al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, C18:1; menos que aproximadamente 7%, menos que aproximadamente 5%, menos que aproximadamente 3%, menos que aproximadamente 1%, o aproximadamente 0%, C18:2; y al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, de ácidos grasos saturados, en donde el método comprende las etapas de: (a) cultivar una población de células microbianas oleaginosas en un medio de cultivo hasta al menos 10% del peso de la célula seca de las células microbianas oleaginosas es aceite triglicérido; y (b) aislar la composición de aceite triglicérido de las células microbianas oleaginosas.

En algunas realizaciones de la invención y ejemplos de la divulgación, el método para producir composiciones de aceite triglicérido microbianas oleaginosas produce aceites triglicéridos que comprenden un perfil de ácido graso en el cual: la cantidad combinada total de C10:0, C12:0 y C14:0 es al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%; la cantidad combinada total de C16:0, C18:0 y C18:1 es al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%; la cantidad combinada total de C18:0, C18:1 y C18:2 es al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%; la cantidad combinada total de C14:0, C16:0, C18:0 y C18:1 es al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100%; la cantidad combinada total de C8:0 y C10:0 es menos que

aproximadamente 50%, menos que aproximadamente 45%, menos que aproximadamente 40%, menos que aproximadamente 35%, menos que aproximadamente 30%, menos que aproximadamente 25%, menos que aproximadamente 20%, menos que aproximadamente 15%, menos que aproximadamente 10%, menos que aproximadamente 5%, o aproximadamente 0%.

5 En algunas realizaciones de la invención y ejemplos de la divulgación, el método para producir composiciones de aceite triglicérido microbianas oleaginosas produce aceites triglicéridos con un perfil de ácido graso que comprende una relación de aceites triglicéridos seleccionada del grupo que consiste de: una relación C8:0 a C10:0 de al menos aproximadamente 5 a 1, al menos aproximadamente 6 a 1, al menos aproximadamente 7 a 1, al menos aproximadamente 8 a 1, al menos aproximadamente 9 a 1, o al menos aproximadamente 10 a 1; una relación C10:0 a C12:0 de al menos aproximadamente 6 a 1, al menos aproximadamente 7 a 1, al menos aproximadamente 8 a 1, al menos aproximadamente 9 a 1, o al menos aproximadamente 10 a 1; una relación C12:0 a C14:0 de al menos aproximadamente 5 a 1, al menos aproximadamente 6 a 1, al menos aproximadamente 7 a 1, al menos aproximadamente 8 a 1, al menos aproximadamente 9 a 1, o al menos aproximadamente 10 a 1; una relación C14:0 a C12:0 de al menos aproximadamente 7 a 1, al menos aproximadamente 8 a 1, al menos aproximadamente 9 a 1, o al menos aproximadamente 10 a 1; y una relación C14:0 a C16:0 de al menos aproximadamente 1 a 2, al menos aproximadamente 1 a 3, al menos aproximadamente 1 a 4, al menos aproximadamente 1 a 5, al menos aproximadamente 1 a 6, al menos aproximadamente 1 a 7, al menos aproximadamente 1 a 8, al menos aproximadamente 1 a 9, o al menos aproximadamente 1 a 10.

### 20 III. MÉTODOS Y MATERIALES DE INGENIERÍA GENÉTICA

La presente invención proporciona métodos y materiales para modificar genéticamente microorganismos, que incluyen células de *Prototheca* y células huésped recombinantes, útiles en los métodos de la presente invención, que incluyen pero sin limitarse a, células huésped de *Prototheca moriformis*, *Prototheca zopfii*, *Prototheca krugani*, y *Prototheca stagnora* recombinantes. La descripción de estos métodos y los materiales se divide en subsecciones para la conveniencia del lector. En la subsección 1, se describen los métodos de transformación. En la subsección 2, se describen métodos de ingeniería genética por medio del uso de la recombinación homóloga. En la subsección 3, se describen vectores de expresión y los componentes.

En ciertas realizaciones de la presente invención se prefiere modificar genéticamente un microorganismo para mejorar la producción de lípidos, modificar las propiedades o proporciones de componentes generados por el microorganismo, o mejorar o proporcionar de nuevo características de crecimiento en una variedad de materiales de materia prima. *Chlorella*, particularmente *Chlorella protothecoides*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella sp.*, y *Chlorella emersonii* son los microorganismos preferidos para usa en los métodos de modificación genética descritos en la presente descripción, aunque pueden usarse otras especies de *Chlorella* así como otras variedades de microorganismos.

Promotores, cADN, y 3'UTR, así como otros elementos de los vectores, pueden generarse a través de técnicas de clonación usando fragmentos aislados a partir de fuentes nativas (ver, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook y otros (3ra edición, 2001, Cold Spring Harbor Press; y la patente de Estados Unidos 4,683,202). Alternativamente, los elementos se pueden generar sintéticamente usando métodos conocidos (ver, por ejemplo, Gene. 1995 Oct 16;164(1):49-53).

#### 45 1. Métodos de Ingeniería – Transformación

Las células se pueden transformar por cualquier técnica adecuada que incluye, por ejemplo, biolística, electroporación (ver Maruyama y otros, (2004) Biotechnology Techniques 8:821-826), transformación por perlas de vidrio y transformación por bigotes de carburo de silicio. Otro método que se puede usar comprende la formación de protoplastos y el uso de CaCl<sub>2</sub> y polietilenglicol (PEG) para introducir ADN recombinante en células de microalgas (ver Kim y otros (2002), *Mar. Biotechnol.* 4:63-73, que reporta el uso de este método para la transformación de *Chlorella ellipsoidea*). La co-transformación de microalgas se puede usar para introducir dos moléculas diferentes de vectores en una célula simultáneamente (ver, por ejemplo Protist 2004 Dic;155(4):381-93).

Los métodos biolísticos (ver, por ejemplo, Sanford, Trends In Biotech. (1988) 6:299 302, patente de Estados Unidos núm. 4,945,050; electroporación (Fromm y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) (1985) 82:5824 5828); uso de un rayo láser, la microinyección o cualquier otro método capaz de introducir ADN en una microalga pueden usarse también para la transformación de una célula de *Prototheca*.

Cualquier técnica conveniente para introducir un transgen en un microorganismo, tal como *Chlorella*, puede emplearse en la presente invención. Dawson y otros (1997) (supra) describen el uso del bombardeo de microproyectiles para introducir el gen de la nitrato reductasa (NR) a partir de *Chlorella vulgaris* en mutantes de *Chlorella sorokiniana* NR-deficientes, lo que resulta en transformantes estables. En resumen, perlas de tungsteno de 0.4 micras se recubrieron con plásmido; 3 X 10<sup>7</sup> células de *C. sorokiniana* se esparcieron en el tercer centro de una placa de agar no selectiva y se bombardeó con el sistema PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery® (Bio-Rad).

Un método preferido para introducir un transgen en un microorganismo, tal como *Chlorella*, es el método descrito por Kim y otros (2002), *Mar. Biotechnol.* 4:63-73. Kim reporta la transformación de protoplastos de *Chlorella ellipsoidea* usando  $\text{CaCl}_2$  y polietilenglicol (PEG). En particular, los protoplastos se prepararon cultivando células de *C. ellipsoidea* a una densidad de  $1\text{-}2 \times 10^8/\text{ml}$ . Las células se recuperaron y lavaron por centrifugación por 5 minutos a 1600 g y se resuspendieron en 5 ml de tampón fosfato (pH 6.0) que contenía 0.6 M de sorbitol, 0.6 M de manitol, 4% (peso/volumen) de celulosa (Calbiochem), 2% (peso/volumen) de macerasa (Calbiochem), y 50 unidades de pectinasa (Sigma). La suspensión de células se incubó a  $25^\circ\text{C}$  por 16 horas en la oscuridad con agitación delicada. Los protoplastos resultantes se recuperaron por centrifugación a 400 g por 5 minutos. La bolilla se resuspendió delicadamente en 5 ml de medio f/2 que contenía 0.6 M de sorbitol y 0.6 M de manitol y se centrifugó a 400 g por 5 minutos. Esta bolilla se resuspendió en 1 ml de una solución 0.6 M de sorbitol/manitol que contenía 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Después, 5 mg del ADN del transgen se añadieron, junto con 25  $\mu\text{g}$  ADN de timo de ternera (Sigma), a  $10^7\text{-}10^8$  protoplastos en 0.4 ml. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de PNC (40% polietilenglicol 4000, 0.8 M NaCl, 50 mM  $\text{CaCl}_2$ ) y se mezcló cuidadosamente por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, 0.6 ml del medio f/2 suplementado con una solución 0.6 M de sorbitol/manitol, 1% de extracto de levadura y se añadió 1% de glucosa, y las células transformadas se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  por 12 horas en la oscuridad para la regeneración de la pared celular. Un método similar se usó por Huang y otros (2007) (supra) para introducir un transgen que codifica la reductasa mercúrica en *Chlorella sp. DT*.

Además, se empleó la electroporación para transformar los microorganismos, tales como *Chlorella*. Como reportó Maruyama y otros (2004), *Biotechnology Techniques* 8:821-826 (incorporado como referencia en la presente descripción en su totalidad), esta técnica se usó para introducir un transgen en los protoplastos de *Chlorella saccharophila* c-211-1a preparados a partir de las células en fase estacionaria. La expresión transitoria del plásmido introducido se observó bajo un campo de resistencia de entre 600 y 900 V/cm, y una duración del pulso de alrededor de 400 ms, donde se verificó una permeabilidad de la membrana mayor que 70-kDa FITC-dextrano.

Los ejemplos de expresión de transgenes en microorganismos, tal como *Chlorella*, pueden encontrarse en la literatura (ver por ejemplo *Current Microbiology* Vol. 35 (1997), págs. 356-362; Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2000 Jul;16(4):443-6; *Current Microbiology* Vol. 38 (1999), págs. 335-341; *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 72: 197-205; *Marine Biotechnology* 4, 63-73, 2002; *Current Genetics* 39:5, 365-370 (2001); *Plant Cell Reports* 18:9, 778-780, (1999); *Biologia Plantarum* 42(2): 209-216, (1999); *Plant Pathol. J* 21(1): 13-20, (2005)). Ver, además, los ejemplos en la presente descripción.

Los vectores para la transformación de microorganismos, de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por técnicas familiares conocidas por aquellos con experiencia en la materia. La secuencia de nucleótidos del constructo usado para la transformación de múltiples especies de *Chlorella* corresponde a la sec. con núm. de ident.: 8. En una realización, un diseño de vector ilustrativo para la expresión de un gen de lipasa en un microorganismo tal como una microalga contiene un gen que codifica una lipasa en unión operable con un promotor activo en microalgas. Alternativamente, si el vector no contiene un promotor en unión operativa con el gen de interés, el gen se puede transformar en las células de tal manera que se convierte en operativamente unido a un promotor endógeno en el punto de la integración del vector. Se demostró que el método de transformación sin promotor funciona en microalgas (ver por ejemplo *Plant Journal* 14:4, (1998), pp.441-447). El vector puede contener además un segundo gen que codifica una proteína que, por ejemplo, imparte resistencia a un antibiótico o herbicida, es decir, un marcador seleccionable. Opcionalmente, uno o los dos genes es/son seguido(s) por una secuencia 3' no traducida que contiene una señal de poliadenilación. Los casetes de expresión que codifican los dos genes pueden estar físicamente unidos en un vector o en vectores separados. También puede usarse la co-transformación de microalgas, en la cual distintas moléculas vector se usan simultáneamente para transformar las células (ver, por ejemplo, *Protist* 2004 Dic;155(4):381-93). Las células transformadas pueden seleccionarse opcionalmente basado en la capacidad para crecer en presencia del antibiótico u otro marcador seleccionable bajo condiciones en las que las células que carecen del casete de resistencia no crecerían.

## **2. Métodos de Ingeniería - Recombinación Homóloga**

La recombinación homóloga es la capacidad de las secuencias de ADN complementarias para alinearse e intercambiar las regiones de homología. El ADN transgénico ("donante") que contiene secuencias homólogas a las secuencias genómicas diana ("patrón") se introduce en el organismo y luego tiene lugar la recombinación dentro del genoma en el sitio de la secuencia genómica homóloga correspondiente. Las etapas mecánicas de este proceso, en la mayoría de los casos, incluyen: (1) aparear los segmentos de ADN homólogos, (2) la introducción de roturas de doble cadena en la molécula de ADN de los donantes, (3) la invasión de la molécula de DNA patrón por los extremos libres del ADN del donante seguida de la síntesis de ADN; y (4) la resolución de los eventos de reparación de las rupturas de la doble cadena que resultan en los productos finales de la recombinación.

La capacidad para llevar a cabo la recombinación homóloga en un organismo huésped tiene muchas implicaciones prácticas, por lo que se puede llevar a cabo a nivel genético molecular y es útil en la generación de un microbio oleaginoso que puede producir aceites específicos. Por su propia naturaleza la recombinación homóloga es

un evento preciso dirigido a los genes, por lo tanto, la mayoría de las líneas transgénicas que se generan con la misma secuencia de orientación serán esencialmente idénticas en términos de fenotipo, por lo que requieren la evaluación de muchos menos eventos de transformación. La recombinación homóloga también apunta a eventos de inserción de genes en el cromosoma del huésped, lo que resulta en una estabilidad genética excelente, incluso en ausencia de selección genética. Debido a que diferentes locus cromosómicos pudieran impactar en la expresión génica, incluso de promotores heterólogos/UTR, la recombinación homóloga puede ser un método para buscar un locus en un ambiente genómico no familiar y evaluar el impacto de estos ambientes en la expresión génica.

Una aplicación particularmente útil de la ingeniería genética que usa la recombinación homóloga es cooptar elementos reguladores específicos del huésped tales como promotores/UTR para dirigir la expresión de genes heterólogos en una forma altamente específica. Por ejemplo, se pudiera esperar que la ablación o la inactivación génica de las familias de genes/gen de desaturasa con un gen heterólogo que codifica un marcador selectivo aumente el porcentaje total de ácidos grasos saturados producidos en la célula huésped. El Ejemplo 11 describe la recombinación homóloga dirigida a los constructos y un ejemplo de tales ablaciones o inactivaciones del gen de la desaturasa generado en *Prototheca moriformis*.

Debido a que la recombinación homóloga es un evento preciso dirigido a los genes, se puede usar para modificar con precisión cualquier nucleótido(s) dentro de un gen o secuencia de interés, siempre y cuando se identifiquen suficientes regiones flancos. Por lo tanto, la recombinación homóloga se puede usar como un medio para modificar secuencias reguladoras que afectan la expresión de genes de ARN y/o proteínas. También se puede usar para modificar las regiones codificantes de proteínas en un esfuerzo por modificar las actividades de enzimas como la especificidad por el sustrato, las afinidades y la Km, y por lo tanto afectar el cambio que se desea en el metabolismo de la célula huésped. La recombinación homóloga proporciona un medio poderoso para manipular el genoma del huésped, lo que da como resultado la mutagénesis dirigida, la conversión de genes, la eliminación de genes, la duplicación de genes, la inversión de genes y el intercambio de elementos de regulación de la expresión génica tales como promotores, potenciadores y 3'UTR.

La recombinación homóloga se puede lograr por medio del uso de constructos de orientación que contienen pedazos de secuencias endógenas para "orientar" el gen o región de interés en el genoma endógeno de la célula huésped. Tales secuencias de orientación pueden situarse ya sea 5' del gen o región de interés, 3' del gen/región de interés o incluso flanquean el gen/región de interés. Tales construcciones de orientación se pueden transformar dentro de la célula huésped, ya sea como un plásmido de ADN superenrollado con un esqueleto de vector adicional, un producto de PCR sin esqueleto de vector, o como una molécula lineal. En algunos casos, puede ser ventajoso exponer primero las secuencias homólogas dentro del ADN transgénico (ADN donante) con una enzima de restricción. Esta etapa puede incrementar la eficiencia de la recombinación y disminuir la ocurrencia de eventos no deseados. Otros métodos para incrementar la eficiencia de recombinación incluyen el uso de PCR para generar ADN transgénico transformado que contiene extremos lineales homólogos a las secuencias genómicas objetivo.

Para los propósitos de ilustración no limitante, las regiones de secuencias de ADN donante que son útiles para la recombinación homóloga incluyen la región KE858 del ADN en *Prototheca moriformis*. KE858 es un fragmento genómico de 1.3 kb, que abarca parte de la región codificante para una proteína que comparte homología con la familia del ARN de transferencia (ARNt) de las proteínas. La transferencia de tipo Southern demostró que la secuencia KE858 estaba presente en una sola copia en el genoma de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435). Esta región y los ejemplos de uso de esta región para la recombinación homóloga dirigida se describen en la solicitud PCT núm. PCT/US2009/66142. Otra región de ADN donador que es útil en porciones de la secuencia genómica 6S ARNr. El uso de esta secuencia en la recombinación homóloga en *Prototheca moriformis* se describe más abajo en los ejemplos.

### **3. Vectores y componentes de vectores**

Los vectores para la transformación de microorganismos, de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por técnicas familiares conocidas por los expertos en la materia en vista de la descripción de la presente. Un vector contiene, típicamente, uno o más genes en el que cada gen codifica para la expresión de un producto deseado (el producto del gen) y se une operativamente a una o más secuencias control que regulan la expresión de genes o dirigen el producto del gen a una localización en la célula recombinante. Para ayudar al lector, esta subsección se divide en subsecciones. La Subsección A describe las secuencias control que se encuentran, típicamente, en los vectores, así como nuevas secuencias de control que se proporcionan en la presente invención. La Subsección B describe genes que se encuentran, típicamente, en los vectores, así como nuevos métodos de optimización del codón y genes que se preparan por medio del uso de los mismos proporcionados por la invención.

#### **A. Secuencias de control**

Las secuencias control son los ácidos nucleicos que regulan la expresión de una secuencia codificante o dirigen un producto del gen a una localización particular dentro o fuera de la célula. Las secuencias de control que regulan la expresión incluyen, por ejemplo, los promotores que regulan la transcripción de una secuencia codificante

y terminadores que terminan la transcripción de una secuencia codificante. Otra secuencia de control es una secuencia 3' no traducida que se localiza al final de una secuencia codificante que codifica una señal de poliadenilación. Las secuencias de control que dirigen los productos de genes a una localización particular incluyen las que codifican péptidos señal, los cuales dirigen la proteína a la que están unidos a una localización particular dentro o fuera de la célula.

Por lo tanto, un diseño de vector ejemplar para la expresión de un gen exógeno en una microalga contiene una secuencia que codifica para un producto del gen deseado (por ejemplo, un marcador de selección, una enzima que modifica la vía de los lípidos, o una enzima de utilización de la sacarosa) en una unión operativa con un promotor activo en microalgas. Alternativamente, si el vector no contiene un promotor en unión operativa con la secuencia codificante de interés, la secuencia codificante se puede transformar dentro de las células de tal manera que se convierte en operativamente unida a un promotor endógeno en el punto de la integración del vector. Se demostró que el método de transformación sin promotor funciona en microalgas (ver por ejemplo Plant Journal 14:4, (1998), págs.441-447).

Muchos promotores están activos en microalgas, lo que incluye promotores que son endógenos a las algas que se transforman, así como promotores que no son endógenos a las algas que se transforman (es decir, promotores de otras algas, promotores de plantas superiores, y los promotores de virus de plantas o virus de algas). Los promotores exógenos o endógenos ilustrativos que son activos en microalgas (así como los genes de resistencia a antibióticos funcionales en microalgas) se describen en la publicación PCT núm. 2008/151149 y las referencias citadas allí).

El promotor que se usa para expresar un gen exógeno puede ser el promotor que se une naturalmente a ese gen o puede ser un gen heterólogo. Algunos promotores están activos en más de una especie de microalgas. Otros promotores son específicos de especie. Los promotores ilustrativos incluyen promotores tales como  $\beta$ -tubulina de *Chlamydomonas reinhardtii*, que se usa en los ejemplos más abajo, y promotores virales, tales como el virus del mosaico de la coliflor (CMV) y virus de la Chlorella, los cuales mostraron ser activos en múltiples especies de microalgas (ver, por ejemplo, Plant Cell Rep. 2005 Mar;23(10-11):727-35; J Microbiol. 2005 Ago;43(4):361-5; Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene;4(1):63-73). Otro promotor que es adecuado usar para la expresión de genes exógenos en *Prototheca* es el promotor/5'UTR de la glutamato deshidrogenasa de la *Chlorella sorokiniana*. Opcionalmente, se usan al menos 10, 20, 30, 40, 50, ó 60 nucleótidos o más de estas secuencias que contienen un promotor. Los promotores ilustrativos útiles para la expresión de genes exógenos en *Prototheca* se enumeran en el listado de secuencias de esta solicitud, tal como el promotor del gen HUP1 de la *Chlorella* (sec. con núm. de ident.: 1) y el promotor de la nitrato reductasa *Chlorella ellipsoidea* (sec. con núm. de ident.: 2). Los promotores del virus Chlorella pueden usarse además para expresar genes en *Prototheca*, tal como las sec. con núms. de ident.: 1-7 de la patente de Estados Unidos 6,395,965. Los promotores adicionales activos en *Prototheca* pueden encontrarse, por ejemplo, in Biochem Biophys Res Commun. 1994 Oct 14;204(1):187-94; Plant Mol Biol. 1994 Oct;26(1):85-93; Virology. 2004 Ago 15;326(1):150-9; y Virology. 2004 Ene 5;318(1):214-23. Otros promotores útiles se describen en detalle en los Ejemplos más abajo.

Un promotor se puede caracterizar generalmente, como constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos son generalmente activos o funcionan para guiar la expresión en todo momento (o en ciertos momentos del ciclo de vida de la célula) en el mismo nivel. Los promotores inducibles, por el contrario, se activan (o se vuelven inactivos) o se regulan significativamente ascendente- o descendentemente solamente en respuesta a un estímulo. Ambos tipos de promotores encuentran aplicación en los métodos de la invención. Los promotores inducibles útiles en la invención incluyen aquellos que median la transcripción de un gen unido operativamente en respuesta a un estímulo, tal como una molécula pequeña suministrada exógenamente (por ejemplo, glucosa, como en la sec. con núm. de ident.: 1), temperatura (calor o frío), la falta de nitrógeno en los medios de cultivo, etc. Los promotores adecuados pueden activar la transcripción de un gen esencialmente silente o regular ascendentemente, preferiblemente de forma substancial, la transcripción de un gen unido operativamente que se transcribe a un nivel bajo. Los ejemplos más abajo describen promotores inducibles adicionales que son útiles en células de *Prototheca*.

La inclusión de la secuencia de control de la región de terminación es opcional, y si se emplea, entonces la elección será la de conveniencia, ya que la región de terminación es relativamente intercambiable. La región de terminación puede ser nativa a la región de iniciación de la transcripción (el promotor), puede ser nativa de la secuencia de ADN de interés, o se puede obtener de otra fuente. Ver, por ejemplo, Chen and Orozco, Nucleic Acids Res. (1988) 16:8411.

La presente divulgación también proporciona secuencias de control y genes recombinantes y vectores que las contienen lo que proporciona la expresión compartimentalizada de un gen de interés. Los organelos para la orientación son los cloroplastos, los plastidios, las mitocondrias y el retículo endoplásmico. Además, la presente invención proporciona secuencias de control y los genes recombinantes y vectores que las contienen lo que proporciona la secreción de una proteína fuera de la célula.

Las proteínas que se expresan en el genoma nuclear de *Prototheca* se pueden dirigir a los plastidios

mediante señales dirigidas al plastidio. Las secuencias dirigidas a los plastidios endógenas para *Chlorella* se conocen, tales como genes en el genoma nuclear de *Chlorella* que codifican proteínas que se dirigen a los plastidios; ver, por ejemplo los números de acceso AY646197 y AF499684 en GenBank, y en una realización, tales secuencias de control se usan en los vectores de la presente invención para dirigir la expresión de una proteína a un plastidio de *Prototheca*.

Los ejemplos más abajo describen el uso de secuencias dirigidas a plastidios de algas para dirigir proteínas heterólogas al compartimiento correcto en la célula huésped. Las bibliotecas de cDNA se realizaron por medio del uso de células de *Prototheca moriformis* y *Chlorella protothecoides* y se describen en la solicitud PCT núm. PCT/US2009/066142.

La expresión de un polipéptido en *Prototheca* puede estar dirigida al retículo endoplásmico. La inclusión de una señal de retención o clasificación apropiada en un vector de expresión garantiza que las proteínas se retengan en el retículo endoplásmico (RE) y no vayan hacia abajo adentro de Golgi. Por ejemplo, el vector IMPACTVECTOR1.3, de Wageningen UR-Plant Research International, incluye la señal KDEL de retención o clasificación bien conocida. Con este vector, la retención en el RE tiene una ventaja práctica ya que se reportó que mejora los niveles de expresión 5 veces o más. La razón principal de esto parece ser que el RE contiene concentraciones más bajas y/o proteasas diferentes responsables de la degradación post-traduccional de proteínas que se expresan que las presentes en el citoplasma. Se conocen las señales de retención del RE funcionales en microalgas verdes. Por ejemplo, ver Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Abr 26;102(17):6225-30.

Un polipéptido puede estar dirigido para la secreción fuera de la célula en el medio de cultivo. Ver Hawkins y otros, Current Microbiology Vol. 38 (1999), págs. 335–341 para los ejemplos de señales de secreción activas en *Chlorella* que pueden usarse, de acuerdo con los métodos de la invención, en *Prototheca*.

Muchos promotores están activos en microalgas, lo que incluye promotores que son endógenos a las algas que se transforman, así como promotores que no son endógenos a las algas que se transforman (es decir, promotores de otras algas, promotores de plantas superiores, y los promotores de virus de plantas o virus de algas). Los promotores exógenos y/o endógenos que son activos en microalgas, y genes de resistencia a los antibióticos funcionales en microalgas se describen por ejemplo, por Curr Microbiol. 1997 Dic;35(6):356-62 (*Chlorella vulgaris*); Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene;4(1):63-73 (*Chlorella ellipsoidea*); Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9 (*Phaeodactylum tricornutum*); Plant Mol Biol. 1996 Abr;31(1):1-12 (*Volvox carteri*); Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 22;91(24):11562-6 (*Volvox carteri*); Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C, PMID: 10383998, 1999 May;1(3):239-251 (Laboratory of Molecular Plant Biology, Stazione Zoologica, Villa Comunale, I-80121 Napoles, Italia) (*Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii*); Plant Physiol. 2002 May;129(1):7-12. (Porphyridium sp.); Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Ene 21;100(2):438-42. (*Chlamydomonas reinhardtii*); Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Feb;87(3):1228-32. (*Chlamydomonas reinhardtii*); Nucleic Acids Res. 1992 Jun 25;20(12):2959-65; Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene;4(1):63-73 (*Chlorella*); Biochem Mol Biol Int. 1995 Ago;36(5):1025-35 (*Chlamydomonas reinhardtii*); J Microbiol. 2005 Ago;43(4):361-5 (*Dunaliella*); Yi Chuan Xue Bao. 2005 Abr;32(4):424-33 (*Dunaliella*); Mar Biotechnol (NY). 1999 May;1(3):239-251. (*Thalassiosira and Phaeodactylum*); Koksharova, Appl Microbiol Biotechnol 2002 Feb;58(2):123-37 (varias especies); Mol Genet Genomics. 2004 Feb;271(1):50-9 (*Thermosynechococcus elongates*); J. Bacteriol. (2000), 182, 211-215; FEMS Microbiol Lett. 2003 Abr 25;221(2):155-9; Plant Physiol. 1994 Jun;105(2):635-41; Plant Mol Biol. 1995 Dic;29(5):897-907 (*Synechococcus* PCC 7942); Mar Pollut Bull. 2002;45(1-12):163-7 (*Anabaena* PCC 7120); Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Mar;81(5):1561-5 (*Anabaena* (varias cepas)); Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27;98(7):4243-8 (*Synechocystis*); Wirth, Mol Gen Genet 1989 Mar;216(1):175-7 (varias especies); Mol Microbiol, 2002 Jun;44(6):1517-31 y Plasmid, 1993 Sep;30(2):90-105 (*Fremyella diplosiphon*); Hall y otros (1993) Gene 124: 75-81 (*Chlamydomonas reinhardtii*); Gruber y otros (1991). Current Micro. 22: 15-20; Jarvis y otros (1991) Current Genet. 19: 317-322 (*Chlorella*); para promotores adicionales ver además la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos 6,027,900.

El promotor que se usa para expresar un gen exógeno puede ser el promotor que se une naturalmente a ese gen o puede ser un gen heterólogo. Algunos promotores están activos en más de una especie de microalgas. Otros promotores son específicos de especie. Los promotores preferidos incluyen promotores tales como RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtii* y promotores virales, tales como el virus del mosaico de la coliflor (CMV) y el virus de la *Chlorella* los cuales mostraron ser activos en múltiples especies de microalgas (ver por ejemplo Plant Cell Rep. 2005 Mar;23(10-11):727-35; J Microbiol. 2005 Ago;43(4):361-5; Mar Biotechnol (NY). 2002 Ene;4(1):63-73). En otras realizaciones, se puede usar el promotor de la malato deshidrogenasa de *Botryococcus*, un ácido nucléico de ese tipo que comprende cualquier parte de la sec. con núm. de ident.: 150, o el promotor RBCS2 de *Chlamydomonas reinhardtii* (sec. con núm. de ident.: 151). Opcionalmente, se usan al menos 10, 20, 30, 40, 50, ó 60 nucleótidos o más de estas secuencias que contienen un promotor. Los promotores endógenos preferidos para las especies del género *Chlorella* son la sec. con núm. de ident.:1 y sec. con núm. de ident.:2.

Los promotores preferidos útiles para la expresión de genes exógenos en *Chlorella* se enumeran en el listado de secuencias de esta aplicación, tal como el promotor del gen HUP1 de la *Chlorella* (sec. con núm. de ident.: 1) y el promotor de la nitrato reductasa *Chlorella ellipsoidea* (sec. con núm. de ident.: 2). Los promotores del visus de

*Chlorella* pueden usarse además para expresar genes en *Chlorella*, tal como las sec. con núms. de ident: 1-7 de la patente de Estados Unidos 6,395,965. Los promotores adicionales activos en *Chlorella* pueden encontrarse, por ejemplo, en Biochem Biophys Res Commun. 1994 Oct 14;204(1):187-94; Plant Mol Biol. 1994 Oct;26(1):85-93; Virology. 2004 Ago 15;326(1):150-9; y Virology. 2004 Ene 5;318(1):214-23.

## B. Optimización de genes y codón

Típicamente, un gen incluye un promotor, la secuencia de codificación, y las secuencias de control de la terminación. Cuando se ensambla por tecnología de ADN recombinante, un gen puede denominarse un casete de expresión y se puede flanquear por sitios de restricción para la inserción adecuada dentro de un vector que se usa para introducir el gen recombinante dentro de una célula huésped. El casete de expresión se puede flanquear por secuencias de ADN del genoma u otros ácidos nucleicos diana para facilitar la integración estable del casete de expresión en el genoma por recombinación homóloga. Alternativamente, el vector y su casete de expresión pueden permanecer sin integrarse, en cuyo caso, el vector incluye, típicamente, un origen de replicación que es capaz de proporcionar la replicación del ADN del vector heterólogo.

Un gen común presente en un vector es un gen que codifica para una proteína, la expresión de la cual permite a la célula recombinante que contiene la proteína que se diferencie de las células que no expresan la proteína. Tal gen y su producto génico correspondiente, se llama un marcador de selección. Cualquiera de una gran variedad de marcadores de selección se puede emplear en una construcción transgénica útil para transformar *Prototheca*. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de resistencia G418, el gen de la nitrato reductasa (ver Dawson y otros (1997), Current Microbiology 35:356-362), el gen de la higromicina fosfotransferasa (HPT; ver Kim y otros (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73), el gen de la neomicina fosfotransferasa, el gen ble, que confiere resistencia a la fleomicina (Huang y otros (2007), Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:197-205), y la aminoglicosido-3'-O-fosfotransferasa (sec. con núm. de ident.: 194), que confiere resistencia a la canamicina. Los métodos para determinar la sensibilidad de las microalgas a los antibióticos son bien conocidos. Por ejemplo, Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9.

Otros marcadores seleccionables que no se basan en antibiótico pueden emplearse además en un constructo del transgen útil para transformar las microalgas generalmente, que incluyen las especies de *Prototheca*. Los genes que confieren la capacidad de utilizar ciertas fuentes de carbono que anteriormente no eran capaces de ser utilizadas por la microalga pueden usarse además como un marcador seleccionable. A modo de ilustración, las cepas de *Prototheca moriformis* típicamente crecen pobremente, si acaso, en sacarosa. Usando un constructo que contiene un gen de sacarosa invertasa puede conferir la capacidad de transformantes positivos para crecer en sacarosa como un sustrato de carbono. Los detalles adicionales sobre el uso de la sacarosa como un marcador seleccionable junto con otros marcadores seleccionables se discuten en la Sección IV más abajo.

El vector de expresión que se usa para preparar una célula hospedera recombinante para su uso en los métodos de la invención incluirá al menos dos, y a menudo tres, genes, si uno de los genes es un marcador de selección. Por ejemplo, una *Prototheca* genéticamente modificada de la invención se puede hacer por la transformación con vectores de la invención que comprenden, además de un marcador de selección, uno o más genes exógenos, tales como, por ejemplo, el gen de la sacarosa invertasa o el gen de la acil ACP-tioesterasa. Uno o ambos genes se pueden expresar por medio del uso de un promotor inducible, el cual permite controlar el tiempo de expresión relativo de estos genes para mejorar el rendimiento de los lípidos y la conversión a ésteres de ácidos grasos. La expresión de los dos o más genes exógenos puede estar bajo el control del mismo promotor inducible o bajo el control de diferentes promotores inducibles (o constitutivos). En la última situación, la expresión de un primer gen exógeno se puede inducir por un primer período de tiempo (durante el cual la expresión de un segundo gen exógeno puede o no inducirse) y la expresión de un segundo gen exógeno se puede inducir por un segundo período de tiempo (durante el cual la expresión del primer gen exógeno puede o no inducirse).

En otros ejemplos, los dos o más genes exógenos (además de cualquier marcador de selección) son: una acil graso ACP tioesterasa y una acil graso-CoA/aldehído reductasa, cuyas acciones combinadas rinden un producto del alcohol. Además se proporcionan otras combinaciones de genes exógenos, que incluyen, sin limitación, una acil graso acp tioesterasa y una acil graso-CoA reductasa para generar aldehídos. En una realización, el vector proporciona la combinación de un una acil graso acp tioesterasa, una acil graso-CoA reductasa y una aldehído graso decarbonilasa para generar alcanos. En cada una de estas realizaciones, uno o más de los genes exógenos se pueden expresar por medio del uso de un promotor inducible.

Otros vectores ilustrativos de la invención que expresan dos o más genes exógenos incluyen aquellos que codifican tanto un transportador de sacarosa y una enzima sacarosa invertasa y aquellos que codifican un marcador de selección y una sacarosa invertasa secretada. La *Prototheca* recombinante transformada con cualquier tipo de vector produce lípidos a un costo de fabricación más bajo debido a la capacidad generada por ingeniería de usar la caña de azúcar (y azúcares derivados del azúcar de caña) como fuente de carbono. La inserción de los dos genes exógenos que se describieron anteriormente se puede combinar con la interrupción de la biosíntesis de polisacáridos a través de mutagénesis dirigida y/o al azar, la cual que dirige el flujo cada vez mayor de carbono a la producción de

5 lípidos. Individualmente y en combinación, la conversión trófica, las modificaciones para alterar la producción de lípidos y el tratamiento con enzimas exógenos alteran la composición lipídica producida por un microorganismo. La alteración puede ser un cambio en la cantidad de lípidos producidos, la cantidad de una o más especies de hidrocarburos producidos en relación con otros lípidos, y/o los tipos de especies de lípidos que se producen en el microorganismo. Por ejemplo, las microalgas se pueden modificar para producir una mayor cantidad y/o porcentaje de TAG.

10 Para la expresión óptima de una proteína recombinante, es beneficioso emplear secuencias de codificación que producen ARNm con codones que se usan preferentemente por la célula huésped que se va a transformar. Así, la expresión adecuada de los transgenes puede requerir que el uso del codón del transgén coincida con el codón específico con sesgo en el organismo en el que se expresa el transgén. Los mecanismos exactos subyacentes a este efecto son muchos, pero incluyen el equilibrio adecuado de los almacenes de ARNt aminoacilados disponibles con las proteínas que se sintetizan en la célula, acoplado a una traducción más eficiente de los transgénicos de ARN mensajero (ARNm) cuando se satisface esta necesidad. Cuando el uso de codones en el transgén no es optimizado, los almacenes de ARNt disponibles no son suficientes para permitir la traducción eficiente del ARNm heterólogo lo que resulta en el estancamiento y la terminación ribosomal y la posible inestabilidad del ARNm transgénico.

20 La presente invención proporciona ácido nucleicos optimizados por codón útiles para la expresión exitosa de las proteínas recombinantes en *Prototheca*. El uso de codones en especies de *Prototheca* se analizó estudiando las secuencias de ADNc aisladas de *Prototheca moriformis*. Este análisis representa la interrogante sobre 24, 000 codones y resultó en la Tabla 2 más abajo.

Tabla 2. Uso de codones preferidos en cepas de *Prototheca*.

25	Ala	GCG	345 (0.36)	Asn	AAT	8 (0.04)
		GCA	66 (0.07)		AAC	201 (0.96)
		GCT	101 (0.11)			
		GCC	442 (0.46)	Pro	CCG	161 (0.29)
30	Cys	TGT	12 (0.10)		CCA	49 (0.09)
		TGC	105 (0.90)		CCT	71 (0.13)
					CCC	267 (0.49)
	Asp	GAT	43 (0.12)	Gln	CAG	226 (0.82)
35		GAC	316 (0.88)		CAA	48 (0.18)
	Glu	GAG	377 (0.96)	Arg	AGG	33 (0.06)
		GAA	14 (0.04)		AGA	14 (0.02)
					CGG	102 (0.18)
40	Phe	TTT	89 (0.29)		CGA	49 (0.08)
		TTC	216 (0.71)		CGT	51 (0.09)
					CGC	331 (0.57)
	Gly	GGG	92 (0.12)	Ser	AGT	16 (0.03)
		GGA	56 (0.07)		AGC	123 (0.22)
45		GGT	76 (0.10)		TCG	152 (0.28)
		GGC	559 (0.71)		TCA	31 (0.06)
	His	CAT	42 (0.21)		TCT	55 (0.10)
		CAC	154 (0.79)		TCC	173 (0.31)
50	Ile	ATA	4 (0.01)	Thr	ACG	184 (0.38)
		ATT	30 (0.08)		ACA	24 (0.05)
		ATC	338 (0.91)		ACT	21 (0.05)
					ACC	249 (0.52)
55	Lys	AAG	284 (0.98)	Val	GTG	308 (0.50)
		AAA	7 (0.02)		GTA	9 (0.01)
	Leu	TTG	26 (0.04)		GTT	35 (0.06)
		TTA	3 (0.00)		GTC	262 (0.43)
		CTG	447 (0.61)	Trp	TGG	107 (1.00)
60		CTA	20 (0.03)			
		CTT	45 (0.06)	Tyr	TAT	10 (0.05)
		CTC	190 (0.26)		TAC	180 (0.95)
65	Met	ATG	191 (1.00)	Terminación	TGA/TAG/TAA	

En otras realizaciones, el gen en el vector recombinante se optimizó por codón con referencia a una cepa de microalgas que no es una cepa *Prototheca*. Por ejemplo, los métodos de registrar los genes para la expresión en microalgas se describen en la patente de Estados Unidos 7,135,290. La información adicional para la optimización por codón está disponible, por ejemplo, en la base de datos de uso de codones del GenBank.

### C. Expresión inducible

La presente divulgación proporciona además el uso de un promotor inducible para expresar un gen de interés. En particular, el uso de un promotor inducible para expresar un gen de lipasa permite la producción de la lipasa después del cultivo del microorganismo cuando las condiciones se han ajustado, si es necesario, para mejorar la transesterificación, por ejemplo, después de la ruptura de las células, reducción del contenido de agua de la mezcla de reacción, y/o adición de alcohol suficiente para conducir la conversión de los TAG a ésteres de ácidos grasos.

Los promotores inducibles útiles en la invención incluyen aquellos que median la transcripción de un gen unido operativamente en respuesta a un estímulo, tal como una molécula pequeña suministrada exógenamente (por ejemplo, la glucosa, como en la sec. con núm. de ident.: 1), temperatura (calor o frío), luz, etc. Los promotores adecuados pueden activar la transcripción de un gen esencialmente silente o regular ascendentemente, preferiblemente de forma sustancial, la transcripción de un gen unido operativamente que se transcribe a un nivel bajo. En este último caso, el nivel de transcripción de la lipasa preferentemente no interfiere significativamente con el crecimiento del microorganismo en el que se expresa.

La expresión de transgenes en *Chlorella* puede llevarse a cabo induciblemente a través de promotores tales como el promotor que conduce el gen transportador de hexosa en *Chlorella* (sec. con núm. de ident.:1). Este promotor se activa fuertemente por la presencia de glucosa en los medios de cultivo.

### D. Expresión de dos o más genes exógenos

Además, un microorganismo genéticamente modificado, tal como una microalga, podría comprender y expresar dos o más genes exógenos, tales como, por ejemplo, una lipasa y un gen lítico, por ejemplo, uno que codifica una enzima de degradación de polisacáridos. Uno o ambos genes se pueden expresar por medio del uso de un promotor inducible, el cual permite controlar el tiempo de expresión relativo de estos genes para mejorar el rendimiento de los lípidos y la conversión a ésteres de ácidos grasos. La expresión de los dos o más genes exógenos puede estar bajo el control del mismo promotor inducible o bajo el control de diferentes promotores inducibles. En la última situación, la expresión de un primer gen exógeno se puede inducir por un primer período de tiempo (durante el cual la expresión de un segundo gen exógeno puede o no inducirse) y la expresión de un segundo gen exógeno se puede inducir por un segundo período de tiempo (durante el cual la expresión del primer gen exógeno puede o no inducirse). En la presente se proporcionan vectores y métodos para modificar los microbios que producen lípidos para metabolizar la sacarosa, el cual es un rasgo ventajoso porque permite a las células modificadas convertir las materias primas de la caña de azúcar en lípidos.

Se proporcionan, además, cepas de microbios genéticamente modificados (por ejemplo, microalgas, levadura oleaginosas, bacteria u hongos) que expresan dos o más genes exógenos, tales como, por ejemplo, una acil graso-ACP tioesterasa y una acil graso-CoA/ aldehído reductasa, la acción combinada de los cuales produce un producto alcohólico. Además se proporcionan otras combinaciones de genes exógenos, que incluyen, sin limitación, una acil graso acp tioesterasa y una acil graso-CoA reductasa para generar aldehídos. Además, esta solicitud proporciona la combinación de una acil graso acp tioesterasa, una acil graso-CoA reductasa y una aldehído graso decarbonilasa para generar alcanos. Uno o más de los genes exógenos se pueden expresar por medio del uso de un promotor inducible.

Los ejemplos de otras modificaciones adecuadas para usar en la presente invención se incluyen cepas modificadas genéticamente de microalgas para expresar dos o más genes exógenos, uno que codifica un transportador de una fuente de carbono fija (tal como sacarosa) y un segundo que codifica una enzima sacarosa invertasa. Los organismos fermentables resultantes producen hidrocarburos a menor costo de fabricación que los que se han obtenidos por métodos previamente conocidos de producción biológica de hidrocarburo. La inserción de los dos genes exógenos que se describieron anteriormente se puede combinar con la interrupción de la biosíntesis de polisacáridos a través de mutagénesis dirigida y/o aleatoria, la cual dirige el flujo cada vez mayor de carbono a la producción de hidrocarburo. Individualmente y en combinación, la conversión trófica, las modificaciones para alterar la producción de hidrocarburos y el tratamiento con enzimas exógenos alteran la composición de los hidrocarburos producida por un microorganismo. La alteración puede ser un cambio en la cantidad de hidrocarburos producidos, la cantidad de una o más especies de hidrocarburos producidos en relación con otros hidrocarburos, y/o los tipos de especies de hidrocarburos que se producen en el microorganismo. Por ejemplo, las microalgas se pueden modificar para producir una mayor cantidad y/o porcentaje de TAG.

### E. Expresión compartimentada

La presente invención proporciona además la expresión compartimentada de un gen de interés. En particular, en realizaciones particulares, puede ser ventajoso dirigir la expresión de la lipasa a uno o varios compartimentos celulares donde se secuestra a partir de la mayoría de los lípidos celulares hasta el inicio de la reacción de transesterificación. Los organelos preferidos para la orientación son los cloroplastos, mitocondrias, y el retículo endoplásmico.

### (1) Expresión en cloroplastos

La expresión de un polipéptido en un microorganismo puede dirigirse a los cloroplastos. Los métodos para dirigir la expresión de un gen heterólogo al cloroplasto se conocen y se pueden emplear en la presente invención. Los métodos para dirigir los productos de genes extraños se describen en Shrier y otros, EMBO J. (1985) 4:25 32. Ver además Tomai y otros Gen. Biol. Chem. (1988) 263:15104 15109 y patente de los Estados Unidos. núm. 4,940,835 para el uso de péptidos de tránsito para la translocación nuclear de los productos de genes en el cloroplasto. Los métodos para dirigir el transporte de proteínas al cloroplasto se revisaron además en Kenauf TIBTECH (1987) 5:40 47. Las secuencias dirigidas al cloroplasto endógenas a *Chlorella* se conocen, tal como los genes en el genoma nuclear de *Chlorella* que codifica proteínas que se dirigen al cloroplasto; ver, por ejemplo, los números de acceso al GenBank AY646197 y AF499684.

Wageningen UR- Plant Research International vende un vector IMPACTVECTOR1.4, que usa la señal de secreción de la subunidad pequeña de la proteína del *Chrysanthemum morifolium* para entregar una proteína heteróloga en el ambiente del estroma del cloroplasto (citoplasmático), trasladándose a través de un sistema de doble membrana. La proteína se fusiona con los 11 primeros aminoácidos de la proteína madura rubisco para permitir el procesamiento adecuado del péptido señal (Wong y otros, Plant Molecular Biology 20: 81-93 (1992)). El péptido señal contiene un intrón natural del gen RbcS.

En otro enfoque, el genoma del cloroplasto es genéticamente modificado para expresar la proteína heteróloga. Se ha descrito la transformación estable de los cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* (un alga verde), usando el bombardeo de las células receptoras con microproyectiles de tungsteno de alta velocidad recubiertos con ADN extraño. Ver, por ejemplo, Boynton y otros, Science (1988) 240: 1534 1538; Blowers y otros Plant Cell (1989) 1:123 132 y Debuchy y otros, EMBO J. (1989) 8: 2803 2809. La técnica de transformación, usando microproyectiles de tungsteno, se describe en Klein y otros, Nature (London) (1987) 7:70 73. Otros métodos de transformación del cloroplasto para plantas y microalgas se conocen. Ver por ejemplo las patentes de Estados Unidos 5,693,507; 6,680,426; y Plant Physiol. 2002 May;129(1):7-12; y Plant Biotechnol J. 2007 May;5(3):402-12.

Como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 6,320,101 (publicada el 20 de noviembre 2001 de Kaplan y otros; que se incorpora en la presente como referencia), las células se pueden tratar químicamente para reducir el número de cloroplastos por célula hasta aproximadamente uno. Después, el ácido nucléico heterólogo se puede introducir en las células a través del bombardeo de partículas con el objetivo de introducir al menos una molécula de ácido nucléico heterólogo en los cloroplastos. El ácido nucléico heterólogo se selecciona de manera que se integre en el genoma del cloroplasto a través de la recombinación homóloga que se efectúa fácilmente por las enzimas propias de los cloroplastos. Con este fin, el ácido nucléico heterólogo incluye, además de un gen de interés, al menos una secuencia de ácido nucléico que se deriva a partir del genoma del cloroplasto. Además, el ácido nucléico heterólogo típicamente incluye un marcador de selección. Detalles adicionales se relacionan con esta técnica se encuentran en las patentes de Estados Unidos núms. 4,945,050 y 5,693,507 las que se incorporan en la presente como referencia. Un polipéptido se puede producir de este modo por el sistema de expresión de la proteína del cloroplasto.

La patente de Estados Unidos núm. 7,135,620 (publicada el 14 de noviembre de 2006 de Daniell y otros, se incorpora en la presente como referencia) describe los vectores de expresión de cloroplastos y métodos relacionados. Los casetes de expresión son constructos de ADN que incluyen una secuencia de codificación y secuencias de control adecuadas para proporcionar la expresión correcta de la secuencia de codificación en el cloroplasto. Los casetes de expresión típicos incluyen los siguientes componentes: la región 5' sin traducir de un gen de microorganismo o gen de cloroplasto tal como psbA que se proveerá para la transcripción y traducción de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés en el cloroplasto; una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés; y una región de terminación de la traducción y transcripción, tal como una región 3' de repetición invertida de un gen del cloroplasto que puede estabilizar el ARN de los genes introducidos, mejorando de ese modo la expresión de genes extraños. El casete puede incluir opcionalmente un gen de resistencia a antibiótico.

Típicamente, el casete de expresión está flanqueado por sitios de restricción convenientes para la inserción en un genoma adecuado. El casete de expresión se puede flanquear por secuencias de ADN del ADN del cloroplasto para facilitar la integración estable del casete de expresión en el genoma del cloroplasto, particularmente por recombinación homóloga. Alternativamente, el casete de expresión puede permanecer sin integrarse, en cuyo caso, el casete de expresión incluye, típicamente, un origen de replicación del cloroplasto, el cual es capaz de proporcionar la replicación del ADN heterólogo en el cloroplasto.

El casete de expresión generalmente incluye una región del promotor de un gen capaz de la expresión en el cloroplasto. La región del promotor podría incluir los promotores obtenibles de genes de cloroplastos, tales como el gen psbA de la espinaca o guisante, o la región del promotor rbcL y atpB del maíz y promotores ARNr. Los ejemplos of promotores se describen en Hanley-Bowdoin y Chua, TIBS (1987) 12:67 70; Mullet y otros, Plant Molec Biol. (1985) 4: 39 54; Hanley-Bowdoin (1986) PhD. Dissertation, the Rockefeller University; Krebbers y otros, Nucleic Acids Res. (1982) 10: 4985 5002; Zurawaki y otros, Nucleic Acids Res. (1981) 9:3251 3270; y Zurawski y otros, Proc. Nat'l Acad Sci. U.S.A. (1982) 79: 7699 7703. Otros promotores pueden identificarse y evaluar la fuerza relativa de los promotores de ese modo identificados, mediante la colocación de un promotor de interés 5' a un gen marcador menos el promotor y observar su eficacia en relación con la transcripción obtenida a partir de, por ejemplo, el promotor del gen psbA, un promotor del cloroplasto relativamente fuerte. La eficacia de la expresión de genes heterólogos se puede mejorar, además, por cualquiera de una variedad de técnicas. Estas incluyen el uso de múltiples promotores insertados en tándem 5' al gen heterólogo, por ejemplo, un promotor doble psbA, la adición de secuencias potenciadoras y similares.

Numerosos promotores activos en el cloroplasto de *Chlorella* se pueden usar para la expresión de genes exógenos en el cloroplasto de *Chlorella* tal como aquellos encontrados en el número de acceso de GenBank NC\_001865 (genoma completo del cloroplasto de *Chlorella vulgaris*).

Donde se desea proporcionar la expresión inducible del gen heterólogo, se pueden incluir en el casete de expresión, un promotor inducible y/o una región 5' sin traducir que contiene secuencias que se proporcionan para la regulación a nivel de la transcripción y/o traducción (en el extremo 3'). Por ejemplo, la región 5' sin traducir puede ser de un gen donde la expresión es regulable por la luz. Del mismo modo, las regiones repetidas invertidas 3' se pueden usar para estabilizar el ARN de los genes heterólogos. Los genes inducibles se pueden identificar por una expresión mejorada en la respuesta a un estímulo particular de interés y una expresión baja o ausente en ausencia del estímulo. Por ejemplo, un gen inducible por la luz se puede identificar donde ocurre la expresión mejorada durante la irradiación con luz, mientras que la expresión sustancialmente reducida o la no expresión ocurre en poca o sin luz. Los promotores regulados por la luz a partir de microalgas verdes se conocen (ver, por ejemplo, Mol Genet Genomics. 2005 Dic;274(6):625-36).

La región de terminación que se emplea será principalmente una de conveniencia, ya que la región de terminación parece ser relativamente intercambiable entre los cloroplastos y la bacteria. La región de terminación puede ser nativa para la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa para la secuencia de ADN de interés, o se puede obtener de otra fuente. Ver, por ejemplo, Chen and Orozco, Nucleic Acids Res. (1988) 16:8411.

Los casetes de expresión pueden transformarse en una célula de la planta de interés por cualquiera de un número de métodos. Estos métodos incluyen, por ejemplo, métodos biolísticos (ver, por ejemplo, Sanford, Trends In Biotech. (1988) 6:299 302, patente de Estados Unidos núm. 4,945,050; electroporación (Fromm y otros, Proc. Natl. Acad Sci., (Estados Unidos) (1985) 82:5824 5828); uso de un rayo láser, microinyección o cualquier otro método capaz de introducir ADN en un cloroplasto.

Las descripciones adicionales de vectores de expresión de cloroplasto adecuados para uso en los microorganismos tales como las microalgas se encuentran en la patente de Estados Unidos núm. 7,081,567 (publicada el 25 de julio de 2006, de Xue y otros); 6,680,426 (publicada el 20 de enero de 2004, de Daniell y otros) y 5,693,507 (publicado el 2 de diciembre de 1997, de Daniell y otros).

Las proteínas expresadas en el genoma nuclear de *Chlorella* se pueden dirigir al cloroplasto usando señales dirigidas al cloroplasto. Las secuencias dirigidas al cloroplasto endógenas a *Chlorella* se conocen, tal como los genes en el genoma nuclear de *Chlorella* que codifica proteínas que se dirigen al cloroplasto; ver, por ejemplo, los números de acceso al GenBank AY646197 y AF499684. Las proteínas pueden expresarse además en el cloroplasto de *Chlorella* por inserción de los genes directamente en el genoma del cloroplasto. La transformación del cloroplasto ocurre típicamente a través de la recombinación homóloga, y se puede realizar si las secuencias del genoma del cloroplasto se conocen por la creación de vectores dirigidos (ver, por ejemplo, la secuencia del genoma completo de un cloroplasto de *Chlorella*; número de acceso al GenBank NC\_001865). Ver las secciones anteriores en la presente para los detalles de la transformación del cloroplasto.

## (2) Expresión en la mitocondria

La expresión de un polipéptido en un microorganismo puede dirigirse a la mitocondria. Se han descrito métodos para la selección productos de genes extraños en las mitocondrias (Boutry y otros, Nature (Londres) (1987) 328:340 342) incluyendo en microalgas verdes (ver, por ejemplo, Mol Gen Genet. 1993 Ene;236(2-3):235-44).

Por ejemplo, un vector de expresión que codifica la señal de secreción adecuada puede dirigir una proteína heteróloga a la mitocondria. El vector IMPACTVECTOR1.5, de Wageningen UR- Plant Research International, usa la señal de secreción CoxIV de levadura, la que demostró liberar proteínas en la matriz mitocondrial. La proteína se fusiona con los 4 primeros aminoácidos de la proteína CoxIV de levadura para permitir el procesamiento adecuado

del péptido señal (Kohler y otros, Plant J 11: 613-621 (1997)). Otras secuencias dirigidas mitocondriales se conocen, incluyendo aquellas funcionales en las microalgas verdes. Por ejemplo, ver FEBS Lett. 1990 Ene 29;260(2):165-8; y J Biol Chem. 2002 Feb 22;277 (8):6051-8.

5 Las proteínas expresadas en el genoma nuclear de *Chlorella* se pueden dirigir a la mitocondria usando señales mitocondriales dirigidas. Ver las secciones anteriores en la presente descripción para los detalles de selección y transformación de la proteína mitocondrial.

### 10 (3) Expresión en el retículo endoplasmático

La expresión de un polipéptido en un microorganismo puede dirigirse al retículo endoplasmático. La inclusión de una señal de retención o clasificación apropiada en un vector de expresión garantiza que las proteínas se retengan en el retículo endoplasmático (RE) y no vayan hacia abajo adentro de Golgi. Por ejemplo, el vector IMPACTVECTOR1.3, de Wageningen UR-Plant Research International, incluye la señal KDEL de retención o clasificación bien conocida. Con este vector, la retención en el RE tiene una ventaja práctica ya que se reportó que mejora los niveles de expresión 5 veces o más. La razón principal de esto parece ser que el RE contiene concentraciones más bajas y/o proteasas diferentes responsables de la degradación post-traducciona de proteínas que se expresan que las presentes en el citoplasma. Se conocen las señales de retención del RE funcionales en microalgas verdes. Por ejemplo, ver Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):6225-30.

20 Aunque los métodos y materiales de la invención permiten la introducción de cualquier gen exógeno en un microorganismo, por ejemplo *Prototheca*, los genes relacionados con el uso de la sacarosa y la modificación de la vía de lípidos son de particular interés, como se discute en las secciones siguientes.

## 25 IV. MARCADORES SELECCIONABLES

### 1. Utilización de la sacarosa

30 En una realización, la célula de *Prototheca* recombinante de la invención contiene además uno o más genes exógenos de utilización de la sacarosa. En varias realizaciones, el uno o más genes codifican una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una fructocinasa, una glucocinasa, una hexocinasa, una sacarosa invertasa, un transportador de sacarosa. Por ejemplo, la expresión de un transportador de sacarosa y una sacarosa invertasa permite a la *Prototheca* transportar la sacarosa al interior de la célula desde el medio de cultivo e hidroliza la sacarosa para producir glucosa y fructosa. Opcionalmente, una fructocinasa se puede expresar también en los casos donde la actividad de la hexocinasa endógena es insuficiente para la fosforilación máxima de fructosa. Los ejemplos de transportadores de sacarosa adecuados son los números de acceso al Genbank CAD91334, CAB92307, y CAA53390. Los ejemplos de fructocinasas adecuados son los números de acceso al Genbank P26984, P26420 y CAA43322.

40 En una realización, la presente invención proporciona una célula hospedera de *Prototheca* que secreta una sacarosa invertasa. La secreción de una sacarosa invertasa evita la necesidad de la expresión de un transportador que pueda transportar la sacarosa hacia el interior de la célula. Esto se debe a que la invertasa secretada cataliza la conversión de una molécula de sacarosa en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa, las cuales se pueden transportar y usar por los microbios proporcionados por la invención. Por ejemplo, la expresión de una sacarosa invertasa (tales como sec. con núm. de ident: 3) con una señal de secreción (tal como sec. con núm. de ident: 4 (de levadura), sec. con núm. de ident: 5 (de plantas superiores), sec. con núm. de ident: 6 (señal consenso de secreción de eucariotas), y sec. con núm. de ident: 7 (combinación de secuencia señales de plantas superiores y el consenso de eucariota) genera la actividad invertasa fuera de la célula. La expresión de esa proteína, como la que permite la metodología de la ingeniería genética se describe en la presente, permite a las células que ya son capaces de usar la glucosa extracelular como fuente de energía usar la sacarosa como fuente de energía extracelular.

55 Las especies de *Prototheca* que expresan una invertasa en medios que contienen sacarosa son una especie preferida de microalgas para la producción de aceite. La expresión y direccionalidad extracelular de esta proteína completamente activa permite a las células hospederas resultantes crecer en sacarosa, mientras que sus contrapartes no transformadas no pueden. Por lo tanto, la presente invención proporciona células *Prototheca* recombinantes con codón optimizado para el gen de la invertasa, incluye pero no se limita al gen de la invertasa de levadura, integrado en su genoma de forma tal que el gen de la invertasa se expresa según se evaluó por la actividad de la invertasa y la hidrólisis de la sacarosa. La presente invención también proporciona los genes de la invertasa útiles como marcadores de selección en las células *Prototheca* recombinantes, ya que estas células son capaces de crecer en sacarosa, mientras que sus contrapartes no transformadas no pueden, y métodos para la selección de las células hospederas recombinantes por medio del uso de una invertasa como un marcador de selección poderoso para la genética molecular de algas.

65 La expresión con éxito de una sacarosa invertasa en *Prototheca* también ilustra otro aspecto de la presente

invención ya que demuestra que proteínas heterólogas (recombinantes) se pueden expresar en la célula de alga y transitar con éxito fuera de la célula y en el medio de cultivo en una forma completamente activa y funcional. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos y reactivos para expresar una amplia y diversa gama de proteínas heterólogas en microalgas y secretarlas fuera de la célula huésped. Tales proteínas incluyen, por ejemplo, enzimas industriales, tales como, por ejemplo, lipasas, proteasas, celulasas, pectinasas, amilasas (*por ejemplo, sec. con* 5 *núm. de ident.: 190-191*), esterases, oxidorreductasas, transferasas, lactasas, isomerasas e invertasas, así como proteínas terapéuticas tales como, por ejemplo, factores de crecimiento, citocinas, anticuerpos de talla completa que comprenden dos cadenas ligeras y dos pesadas, Fab, scFv (fragmento variable de simple cadena), anticuerpos tipo-camello, fragmentos de anticuerpos, fusiones de fragmentos de anticuerpos, fusiones de anticuerpo-receptor, 10 insulina, interferones, y factores de crecimiento tipo insulina.

La expresión exitosa de una sacarosa invertasa en *Prototheca* también ilustra otro aspecto de la presente invención, ya que proporciona métodos y reactivos para el uso de péptidos de tránsito de hongos en las algas para 15 dirigir la secreción de proteínas en *Prototheca*; y los métodos y reactivos para determinar si un péptido puede funcionar, y su capacidad de funcionar, como un péptido de tránsito en células de *Prototheca Prototheca*. Los métodos y reactivos de la invención se pueden usar como una herramienta y plataforma para identificar otros péptidos para transportar con éxito proteínas al exterior de una célula, y que la invertasa de levadura tiene gran utilidad en estos métodos. Como se demuestra en este ejemplo, la eliminación del péptido de tránsito de invertasa 20 endógeno de levadura y su sustitución por otros péptidos de tránsito, ya sean endógenos a las algas hospedadoras o de otras fuentes (eucariotas, procariotas y virus), puede identificar si cualquier péptido de interés puede funcionar como un péptido de tránsito para guiar a las proteínas en su salida de la célula.

Los ejemplos de sacarosa invertasas adecuadas incluyen aquellos identificados por los números de acceso al Genbank CAB95010, NP\_012104 y CAA06839. Los ejemplos no limitantes de invertasas adecuadas se enumeran 25 más abajo en la Tabla 3. Las secuencias de aminoácido para cada invertasa enumerada se incluyeron en el listado de secuencias más abajo. En algunos casos, el gen exógeno de utilización de la sacarosa adecuado para usar en los métodos y vectores de la invención codifican para una sacarosa invertasa que tiene al menos 40, 50, 60, 75, o 90% o mayor identidad de aminoácido con una sacarosa invertasa seleccionada de la Tabla 3.

30 Tabla 3. Sacarosa invertasas.

DESCRIPCIÓN	Organismo	Núm. acceso al	Sec. con núm. de ident.:
Invertasa	<i>Chicorium intybus</i>	Y11124	Sec. con núm. de ident.: 20
Invertasa	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	AB011433	Sec. con núm. de ident.:21
beta-fructofuranosidasa (invertasa)	<i>Pichia anomala</i>	X80640	Sec. con núm. de ident.:22
Invertasa	<i>Debaryomyces occidentalis</i>	X17604	Sec. con núm. de ident.: 23
Invertasa	<i>Oryza sativa</i>	AF019113	Sec. con núm. de ident.: 24
Invertasa	<i>cepa Allium</i>	AJ006067	Sec. con núm. de ident.: 25
Invertasa	<i>Beta vulgaris subsp. Vulgaris</i>	AJ278531	Sec. con núm. de ident.: 26
beta-fructofuranosidasa (invertasa)	<i>Bifidobacterium breve UCC2003</i>	AAT28190	Sec. con núm. de ident.: 27
Invertasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012104	sec. con núm. de ident.:8 (nucleótido)
			sec. con núm. de ident.:28 (aminoácido)

(continuación)

DESCRIPCIÓN	Organismo	Núm. acceso al	Sec. con núm. de ident.:
Invertasa A	<i>Zymomonas mobilis</i>	AAO38865	Sec. con núm. de ident.: 29
Invertasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_566464	Sec. con núm. de ident.: 188

La secreción de una invertasa al medio de cultivo por *Prototheca* permite a las células crecer también en melazas residuales del procesamiento de la caña de azúcar como lo hacen en glucosa pura de grado-reactivo; el uso de este producto de desecho de poco valor del procesamiento de la caña de azúcar puede proporcionar importantes ahorros en los costos en la producción de lípidos y otros aceites. Por lo tanto, la presente invención proporciona un cultivo de microorganismos que contiene una población de microorganismos *Prototheca*, y un medio de cultivo que comprende (i) sacarosa y (ii) una enzima sacarosa invertasa. En varias realizaciones la sacarosa en el cultivo viene de sorgo, remolacha azucarera, caña de azúcar, melaza, o material celulósico despolimerizado (que opcionalmente puede contener lignina). En otro aspecto, los métodos y reactivos de la invención aumentan significativamente el número y tipos de materias primas que puede usar la *Prototheca* recombinante. Mientras que los microbios que se ejemplifican aquí se alteran de tal forma que pueden usar la sacarosa, los métodos y reactivos de la invención se pueden aplicar de manera que las materias primas, tales como celulósicas son usables por un microbio hospedero modificados de la invención con la capacidad de secretar celulasas, pectinasas, isomerasas, o similares, de tal manera que los productos de degradación de las reacciones enzimáticas ya no son simplemente tolerados, sino más bien se usan como fuente de carbono por el hospedero. Un ejemplo de esto se describe más abajo y en los ejemplos de microbios manipulados para expresar una  $\alpha$ -galactosidasa secretable, que confiere la capacidad de hidrolizar los enlaces de  $\alpha$ -galactosilo en oligosacáridos tales como aquellos contenidos en rafinosa y estaquirosa que son dos oligosacáridos que se necunetran en las corrientes de residuos agrícolas.

## 2. Expresión en alfa-galactosidasa

Aunque la expresión de una sacarosa invertasa, como se describió anteriormente, confiere la capacidad a las células de *Prototheca* de utilizar más eficientemente la sacarosa como una fuente de carbono (a través de la hidrólisis enzimática del enlace- $\alpha$  entre las moléculas de fructosa y glucosa en el disacárido sacarosa), la expresión de otras enzimas que hidrolizan otros tipos de enlaces- $\alpha$  en oligosacáridos puede conferir la capacidad para que las células de *Prototheca* utilicen otras fuentes de carbono. La expresión de estas enzimas (y la habilidad resultante para utilizar fuentes de carbono que *Prototheca* y otras células de microalgas que ordinariamente no serían capaces) se puede usar como un marcador selectivo para estas células de *Prototheca* transgénicas al permitir la selección de clones positivos que son capaces de crecer en estas fuentes de carbono.

En una realización, la célula de *Prototheca* recombinante de la invención contiene además uno o más genes exógenos que codifican enzimas degradantes de polisacárido. En varias realizaciones, el uno o más genes que codifican enzimas degradantes de polisacárido es un gen que codifica una  $\alpha$ -galactosidasa secretada. La expresión de una  $\alpha$ -galactosidasa secretada exógenamente en una célula de *Prototheca* confiere la capacidad a tal cepa transformada de crecer en azúcares (fuentes de carbono) que contienen enlaces D-galactosilo, tales como  $\alpha$ -enlaces entre unidades de monosacárido de galactosa y glucosa. Cepas de *Prototheca* que expresan una  $\alpha$ -galactosidasa secretada, exógena, serán capaces de usar disacáridos tales como melibiosa (disacárido compuesto de  $\alpha$ -D-galactosa-glucosa).

Azúcares tales como rafinosa (un trisacárido compuesto de galactosa-glucosa-fructosa  $\alpha$ -enlazadas) y estaquirosa (un tetrasacárido compuesto de dos unidades de D-galactosa  $\alpha$ -enlazadas, seguido de glucosa y fructosa  $\alpha$ -enlazadas) se presentan en proporciones significativas en corrientes de desechos de agricultura tal como, pulpa de remolacha (rafinosa) y harina de soja (estaquirosa). Tales residuos de la agricultura representan una significativa fuente de carbono no utilizada para la conversión en aceite por los microbios (que incluyen *Prototheca*) capaces de usarlos.

Las cepas de *Prototheca* son incapaces de usar oligosacáridos tales como rafinosa y estaquirosa en ninguna cantidad significativa en lo absoluto. En el caso de rafinosa y estaquirosa, aunque las cepas transgénicas que expresan una invertasa de sacarosa (como se describió anteriormente) tienen la capacidad de hidrolizar el  $\alpha$ -enlace entre fructosa y glucosa en un derivado  $\alpha$ -galactosilo de sacarosa, pero el resto del oligosacárido permanece sin usarse, ya que la invertasa de sacarosa no escinde los restantes  $\alpha$ -enlaces en tales azúcares y los disacáridos resultantes no son usables. En otra realización, la célula de *Prototheca* recombinante de la invención comprende un gen exógeno que codifica una sacarosa invertasa y un gen exógeno que codifica una  $\alpha$ -galactosidasa. Así, las cepas que expresan una sacarosa invertasa y una  $\alpha$ -galactosidasa serán capaces de hidrolizar completamente los oligosacáridos tales como rafinosa y estaquirosa, lo que permite el consumo de los componentes monómeros. Adicionalmente, los genes que codifican la  $\alpha$ -galactosidasa pueden usarse como un marcador seleccionable para la

transformación. Los clones que contienen el gen de  $\alpha$ -galactosidasa exógeno tendrán la capacidad de crecer en melibiosa. Los ejemplos de genes de  $\alpha$ -galactosidasa adecuados para usar en cepas de *Prototheca* incluyen el gen *MEL1* de *Saccharomyces carlbergensis*, el gen *AglC* de *Aspergillus niger*. Notablemente, no todos los genes de  $\alpha$ -galactosidasa son funcionales en las especies de *Prototheca*, aun si los genes se optimizan de acuerdo con el uso de codones preferidos en cepas de *Prototheca*. Los ejemplos más abajo demuestran la capacidad de las células de *Prototheca* transgénicas de crecer en melibiosa cuando se transforman con un gen *MEL1* optimizado por codón de *S. carlbergensis* y el gen de *AglC* de *A. niger*, pero no un gen que codifica  $\alpha$ -galactosidasa a partir de la planta superior, *Cyamopsis tetragonobola* (semilla de guar).

### 3. Complementación auxotrófica de tiamina

Las cepas de *Prototheca* que incluyen *Prototheca moriformis* se conocen que son tiamina auxotróficas (ver, por ejemplo, Ciferri, O. (1956) *Nature*, v.178, págs. 1475-1476), lo que significa que estas cepas requieren tiamina en el medio nutriente para el crecimiento. La auxotrofia de tiamina puede ser el resultado de mutaciones o la pérdida de la expresión de enzimas en la vía biosintética de tiamina. Las cepas transgénicas complementadas que expresan las enzima(s) que faltan en la ruta biosintética de la tiamina pueden después crecer sin añadirles tiamina, y así se reduce el costo del medio nutriente así como se hace la biomasa de microalgas resultante más deseable desde el punto de vista de la nutrición animal. La complementación con una enzima de la ruta biosintética de la tiamina se puede usar además como un marcador seleccionable ya que el gen transgénico confiere la capacidad de crecer en placas/medios que no contienen tiamina.

En una realización, la célula de *Prototheca* recombinante de la invención contiene además uno o más genes exógenos que codifican la enzima de la vía biosintética de tiamina. En otra realización, la célula de *Prototheca* recombinante de la invención comprende un gen exógeno que codifica las hidroximetilpirimidina fosfato sintasas (por ejemplo, sec. con núm. de ident.: 192) a partir de algas, plantas o fuentes cianobacterianas. En aún otras realizaciones, la hidroximetilpirimidina fosfato sintasa es codificada por un gen *THIC*. En aún otras realizaciones, el gen *THIC* es el *THIC* C-169 de *Coccomyxa*, *THIC* de *Arabidopsis thaliana*, el *THIC* PCC 6803 de *Synechocystis* sp, o el *THIC* de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str.* (sec. con núm. de ident.: 193). Los ejemplos más abajo detallan la modificación de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 con el prototipo de tiamina restaurado.

### 4. Otros marcadores seleccionables

Cualquiera de una amplia variedad de marcadores seleccionables se puede emplear en el constructo de un transgen útil para la transformación de microorganismos, tales como *Chlorella*. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de nitrato reductasa, el gen de la higromicina fosfotransferasa (HPT), el gen de la neomicina fosfotransferasa, y el gen ble, que confiere resistencia a fleomicina. Los métodos para determinar la sensibilidad de las microalgas a los antibióticos son bien conocidos. Por ejemplo, Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9.

Más específicamente, Dawson y otros (1997), "Current Microbiology" 35:356-362 (incorporada como referencia en la presente descripción en su totalidad), describen el uso del gen de la nitrato reductasa (NR) de *Chlorella* como un marcador seleccionable para mutantes de *Chlorella sorokiniana* deficientes en NR. Kim y otros (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73 (incorporada como referencia en la presente descripción en su totalidad), describen el uso del gen HPT como un marcador seleccionable para transformar la *Chlorella ellipsoidea*. Huang y otros (2007), Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:197-205 (incorporada como referencia en la presente descripción en su totalidad), reportaron el uso de Sh ble como un marcador seleccionable para *Chlorella* sp. DT

## V. INGENIERÍA DE LA VÍA LIPÍDICA

Adicionalmente a alterar la capacidad de los microorganismos (por ejemplo, microalgas, levadura oleaginosa, hongos, o bacterias), tales como *Prototheca* para utilizar materias primas como materias primas que contienen sacarosa, la presente invención proporciona además microorganismos recombinantes (por ejemplo, *Prototheca*) que se modificaron para alterar las propiedades y/o proporciones de lípidos producidos. La vía se puede además, o alternativamente, modificar para alterar las propiedades y/o proporciones de varias moléculas de lípidos que se producen a través del procesamiento enzimático de los lípidos y los intermedios en las vías del ácido graso. En varias realizaciones, los microorganismos recombinantes (por ejemplo, células de *Prototheca*) de la invención tienen, en comparación con sus contrapartes no transformadas, un rendimiento de lípidos optimizado por unidad de volumen y/o por unidad de tiempo, longitud de la cadena de carbono (por ejemplo, para la producción de diesel renovable o para aplicaciones de la industria química que requieren materias primas lipídicas), número reducido de dobles o triples enlaces, opcionalmente a cero, y un aumento de la relación hidrógeno:carbono de una especie particular de lípidos o de una población de lípidos distintos. Adicionalmente, los microorganismos que producen hidrocarburos deseables pueden manipularse para producir tales componentes en cantidades superiores, o con mayor especificidad.

En el caso de microalgas, algunas células silvestre ya tienen buenas características de crecimiento pero no producen los tipos o cantidades deseadas de lípidos. Los ejemplos incluyen, sin limitarse a, *Pyrobotrys*, *Phormidium*, *Agmenellum*, *Carteria*, *Lepocinclis*, *Pyrobotrys*, *Nitzschia*, *Lepocinclis*, *Anabaena*, *Euglena*, *Spirogyra*, *Chlorococcum*, *Tetraedron*, *Oscillatoria*, *Phagus*, y *Chlorogonium*, que tienen las características de crecimiento deseadas en drenaje municipal o agua de desecho. Tales células, así como especies de *Chlorella*, *Prototheca* y otros microbios, pueden manipularse para tener características de producción de lípidos mejoradas. Las características deseadas incluyen optimizar el rendimiento de lípidos por unidad de volumen y/o por unidad de tiempo, la longitud de cadena de carbono (*por ejemplo*, para la producción de biodiesel o para aplicaciones industriales que requieren materias primas de hidrocarburo), reducir el número de dobles o triples enlaces, opcionalmente a cero quitar o eliminar anillos y estructuras cíclicas e incrementar la relación hidrógeno: carbono de una especie particular de lípido o de una población de lípidos distintos. Además, las microalgas que producen hidrocarburos adecuados pueden modificarse, además, para tener rendimiento de hidrocarburos aún más deseables. Los ejemplos de tales microalgas incluyen especies del género *Chlorella* y el género *Prototheca*.

En ejemplos particulares, una o más enzimas claves que controlan puntos de ramificación en el metabolismo de la síntesis de ácidos grasos se regularon ascendente o descendientemente para mejorar la producción de lípidos. La regulación ascendente se puede lograr, por ejemplo, mediante la transformación de células con construcciones de expresión en las que un gen que codifica la enzima de interés se expresa, por ejemplo, por medio del uso de un promotor fuerte y/o elementos potenciadores que aumentan la transcripción. Tales construcciones pueden incluir un marcador de selección de manera que los transformantes pueden ser objeto de selección, la cual puede resultar en una amplificación de la construcción y un aumento en el nivel de expresión de la enzima codificada. Los ejemplos de enzimas adecuadas para la regulación ascendente de acuerdo con los métodos de la invención incluyen la piruvato deshidrogenasa, que desempeña un papel en la conversión del piruvato a acetil-CoA (ejemplos, algunas de microalgas, incluyen números de acceso en Genbank NP\_415392; AAA53047; Q1XDM1; y CAF05587). La regulación ascendente de la piruvato deshidrogenasa puede aumentar la producción de acetil-CoA, y de ese modo aumentar la síntesis de ácidos grasos. La acetil-CoA carboxilasa cataliza la etapa inicial en la síntesis de ácidos grasos. En consecuencia, esta enzima se puede regular ascendientemente para aumentar la producción de ácidos grasos (ejemplos, algunas de microalgas, incluyen números de acceso de Genbank BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP\_537052; YP\_536879; NP\_045833 y BAA57908). La producción de ácidos grasos también se puede incrementar por regulación ascendente de la proteína portadora de acilo (ACP), la cual transporta las cadenas de acilo en crecimiento durante la síntesis de ácidos grasos (ejemplo, algunas de microalgas, incluyen números de acceso en Genbank A0T0F8; P51280; NP\_849041; YP\_874433). La glicerol-3-fosfato acil transferasa cataliza el paso limitante de la velocidad de la síntesis de ácidos grasos. La regulación ascendente de esta enzima puede aumentar la producción de ácidos grasos (por ejemplo, algunas de microalgas, incluyen números de acceso en Genbank AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857 y ABO94442).

La regulación ascendente o descendente de los genes se puede aplicar a los reguladores globales que controlan la expresión de los genes de las vías biosintéticas de los ácidos grasos. En consecuencia, uno o más reguladores globales de la síntesis de ácidos grasos se regula positiva o negativamente, según proceda, para inhibir o aumentar, respectivamente, la expresión de una pluralidad de genes sintéticos de ácidos grasos y, en última instancia, aumentar la producción de lípidos. Los ejemplos incluyen las proteínas de unión a elementos reguladores del esteroide, (SREBPs), tales como SREBP-1a y SREBP-1c (para ejemplos ver los números de acceso en Genbank NP\_035610 y Q9WTN3).

La presente divulgación proporciona además microorganismos recombinantes (*por ejemplo*, células de *Prototheca*) que se modificaron para contener uno o más genes exógenos que codifican enzimas para la modificación de lípidos tales como, por ejemplo, acilo graso-ACP tioesterasas (*por ejemplo*, *C. callophylla* (sec. con núm. de ident.: 145 y sec. con núm. de ident.: 146; ver además la Tabla 4), acil graso-CoA/aldehído reductasas (ver la Tabla 6), acil graso-CoA reductasas (ver la Tabla 7), aldehído graso decarbonilasa (ver la Tabla 8), aldehído graso reductasas, desaturasas (tal como desaturasas de estearoil-ACP (*por ejemplo*, una *R. communis* SAD, sec. con núm. de ident.: 147 y sec. con núm. de ident.: 148) optimizada por codón y acil graso desaturasas y escualeno sintasas (ver el número de acceso al GenBank AF205791). En algunas realizaciones, los genes que codifican la acil graso ACP tioesterasa y una proteína portadora de acilo que se co-expresa naturalmente se transforman dentro de una célula *Prototheca*, opcionalmente con uno o más genes que codifican otras enzimas para la modificación de lípidos. En otras realizaciones, la ACP y la acil graso ACP tioesterasa pueden tener una afinidad una por la otra que da una ventaja cuando las dos se usan juntas en los microbios y los métodos de la presente invención, sin tomar en cuenta si ellas se co-expresan naturalmente o no en un tejido u organismo particular. Por lo tanto, la presente invención contempla tanto pares de estas enzimas que se co-expresan naturalmente como aquellas que comparten una afinidad para interactuar una con la otra para facilitar la escisión de una cadena de carbono de longitud específica a partir de ACP.

En aún otros ejemplos, un gen exógeno que codifica una desaturasa se transforma dentro del microorganismo (*por ejemplo*, una célula de *Prototheca*) en conjunto con uno o más genes que codifican otras enzimas de modificación de lípidos para proporcionar modificaciones con respecto a la saturación de lípidos. En otras realizaciones, un gen desaturasa endógeno se sobreexpresa (por ejemplo, a través de la introducción de

copias adicionales del gen) en el microorganismo (*por ejemplo*, una célula de *Prototheca*). La estearoil ACP desaturasa (ver, por ejemplo, números de acceso al GenBank AAF15308; ABM45911; y AAY86086), por ejemplo, cataliza la conversión de estearoil acp a oleoil ACP. La regulación ascendente de este gen puede aumentar la proporción de ácidos grasos monoinsaturados producida por una célula, mientras que la regulación descendente puede reducir la proporción de monoinsaturados. Para propósitos ilustrativos, las estearoil-ACP desaturasas (SAD) son responsables por la síntesis de ácidos grasos C18:1 a partir de precursores C18:0. Otra familia de desaturasas son las acil graso desaturasas (FAD), que incluyen desaturasas de ácido graso delta 12 ( $\Delta$ 12 FAD). Estas desaturasas además proporcionan modificaciones con respecto a la saturación de lípidos. Para propósitos ilustrativos, las desaturasas de ácido graso delta 12 son responsables de la síntesis de ácidos grasos C18:2 a partir de precursores C18:1. Del mismo modo, la expresión de una o más desaturasas de glicerolípidos se puede controlar para alterar la relación de ácidos grasos insaturados a saturados tales como ácido graso  $\omega$ -6 desaturasa, ácidos grasos  $\omega$ -3 desaturasa, o  $\omega$ -6-oleato desaturasa. En algunas realizaciones, la desaturasa se puede seleccionar con referencia a una longitud de cadena de carbón deseada, de manera que la desaturasa es capaz de hacer modificaciones en ubicaciones específicas dentro de un sustrato de longitud de carbonos especificado, o sustratos que tienen una longitud de carbonos dentro de un rango especificado. En otra realización, si el perfil de ácidos grasos deseado es un aumento en monoinsaturados (tales como C16:1 y/o C18:1) la sobre expresión de una SAD o la expresión de una SAD heterólogo se puede acoplar con el silenciamiento o inactivación (por ejemplo, a través de mutación, iARN, knockout de un gen de desaturasa endógeno, etc) de una acil graso desaturasa (FAD).

En otros ejemplos, los microorganismos (*por ejemplo*, células de *Prototheca*) se modificaron para tener un gen de desaturasa endógeno mutado, en donde la mutación inactiva al gen o la enzima desaturasa. En algunos casos, el gen desaturasa endógeno mutado es una desaturasa de ácido graso (FAD). En otros casos, el gen mutado de desaturasa endógeno es una proteína transportadora estearoil acil desaturasa (SAD). El Ejemplo 11 más abajo describe la ablación dirigida o knockout de estearoil-ACP desaturasas y desaturasas de ácido graso delta 12.

En algunos casos, puede ser ventajoso aparear una o más técnicas de ingeniería genética para lograr una célula transgénica que produce el perfil de lípidos deseado. En una realización, un microorganismo (*por ejemplo*, una célula de *Prototheca*) comprende un gen mutado de desaturasa endógeno y uno o más genes exógenos. En ejemplos no-limitantes, una célula de *Prototheca* con un gen mutado de desaturasa endógeno puede además expresar un gen de acil graso-ACP tioesterasa exógeno y/o un gen de sacarosa invertasa. El ejemplo 11 más abajo describe una célula transgénica de *Prototheca* que contiene una ablación dirigida o knockout de una SAD endógeno y además expresa una tioesterasa que prefiere C14 y una sacarosa invertasa de *Cinnamomum camphora*. En este caso, la célula de *Prototheca* transgénica produce un perfil de lípidos que se aproxima estrechamente al perfil de lípidos que se encuentra en el sebo. El sebo se deriva típicamente de grasa de ternera o de oveja fundida, es sólido a temperatura ambiente y se usa en una variedad de aplicaciones en las industrias de alimentos, cosméticos y químicos. El perfil de ácido graso del sebo es: 4% C14:0; 26% C16:0; 3% C16:1; 14% C18:0; 41% C18:1; 3% C18:2; y 1% C18:3. Como se muestra en el Ejemplo 11 más abajo, los clones de células transgénicas de *Prototheca* con una ablación dirigida o knockout de una SAD endógeno y que expresan una tioesterasa que prefiere C14 de *C. camphora* tienen un perfil de lípidos de: menos de 1% C12 y ácidos grasos de longitud de cadena de carbonos más corta; 2.74% a 6.13% C14:0; 23.07% a 25.69% C16:0; 7.02% a 11.08% C18:0; 42.03% a 51.21% C18:1; y 9.37% a 13.45% C18:2 expresado en porcentaje de área). En algunos casos, las células de *Prototheca* transgénica tienen perfiles de lípidos de: 3-5% C14:0; 25-27% C16:0; 10-15% C18:0; y 40-45% C18:1.

Así, en ejemplos particulares, los microbios de la presente invención son manipulados genéticamente para expresar uno o más genes exógenos seleccionados de una acil acp tioesterasa, una acyl-CoA/aldehído reductasa, una acil graso-CoA reductasa, una aldehído graso reductasa, una aldehído graso decarbonilasa, o una proteína transportadora de acilo naturalmente expresada. Los métodos de expresión adecuados se describen anteriormente en relación con la expresión de un gen de la lipasa, incluyendo, entre otros métodos, la expresión inducible y la expresión compartimentada. Una acil graso ACP tioesterasa escinde un ácido graso de una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis de lípidos. Mediante procesamiento enzimático adicional, el ácido graso escindido se combina con una coenzima para producir una molécula de acil-CoA. Este acil-CoA es el sustrato para la actividad enzimática de la acil graso-CoA reductasa para producir un aldehído, así como para una acil graso-CoA/aldehído reductasa para producir un alcohol. El aldehído que se produce por la acción de la acil graso-CoA reductasa identificada arriba es el sustrato para la actividad enzimática adicional ya sea por una aldehído graso reductasa para producir un alcohol, o una aldehído graso decarbonilasa para producir un alcano o alqueno.

En algunas ejemplos, los ácidos grasos, los glicerolípidos, o los alcoholes primarios correspondientes, los aldehídos, los alcanos o alquenos, que se generan por los métodos que se describen en la presente, contienen 8, 10, 12 o 14 átomos de carbono. Los ácidos grasos preferidos para la producción de diesel, biodiesel, diesel renovable, o combustible para aviones, o los correspondientes alcoholes primarios, aldehídos, alcanos y alquenos, para aplicaciones industriales contienen de 8 a 14 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, los ácidos grasos anteriores, así como las otras moléculas de hidrocarburo correspondientes, están saturados (sin ningún doble o triple enlace carbono-carbono), mono insaturados (un solo doble enlace); poli insaturado (dos o más dobles enlaces); es lineal (no cíclico) o ramificado. Para la producción de combustible, se prefiere una mayor saturación.

Las enzimas que se describen directamente arriba tienen una especificidad preferencial para la hidrólisis de un sustrato que contiene un número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, una acil graso acp tioesterasa puede tener preferencia por la escisión de un ácido graso que tiene 12 átomos de carbono de acp. En algunas realizaciones, la ACP y la tioesterasa de longitud específica pueden tener una afinidad una por la otra que las hace especialmente útiles en una combinación (por ejemplo, los genes exógenos de la acp y la tioesterasa se pueden co-expresar naturalmente en un determinado tejido u organismo del cual se derivan). Por lo tanto, en varias realizaciones, las células de *Prototheca* recombinantes de la invención pueden contener un gen exógeno que codifica una proteína con especificidad para catalizar una actividad enzimática (por ejemplo, la escisión de un ácido graso de una ACP, la reducción de un acil-CoA a un aldehído o un alcohol, o la conversión de un aldehído a un alcano) con respecto al número de átomos de carbono contenidos en el sustrato. La especificidad enzimática puede, en varias realizaciones, ser por un sustrato que tiene de 8 a 34 átomos de carbono, preferentemente de 8 a 18 átomos de carbono, y con mayor preferencia de 8 a 14 átomos de carbono. Una especificidad preferida es por un sustrato que tiene menos, es decir, 12, mejor que más, es decir, 18 átomos de carbono.

Otras tioesterasas acil-ACP grasas adecuadas para usar con los microbios y métodos de la invención incluyen, sin limitarse a, las enumeradas en la Tabla 4.

Tabla 4. Acil graso-ACP tioesterasas y números de acceso al GenBank.

20	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Umbellularia californica</i> (GenBank #AAC49001) (sec. con núm. de ident.: 203)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cinnamomum camphora</i> (GenBank #Q39473)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Umbellularia californica</i> (GenBank #Q41635)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Myristica fragrans</i> (GenBank #AAB71729) (sec. con núm. de ident.: 224)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Myristica fragrans</i> (GenBank #AAB71730) (sec. con núm. de ident.: 222)
25	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Elaeis guineensis</i> (GenBank #ABD83939) (sec. con núm. de ident.: 204)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Elaeis guineensis</i> (GenBank #AAD42220)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Populus tomentosa</i> (GenBank #ABC47311) (sec. con núm. de ident.: 207)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (GenBank #NP_172327) (sec. con núm. de ident.: 208)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (GenBank #CAA85387) (sec. con núm. de ident.: 209)
30	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (GenBank #CAA85388) (sec. con núm. de ident.: 210)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Gossypium hirsutum</i> (GenBank #Q9SQI3) (sec. con núm. de ident.: 211)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea lanceolata</i> (GenBank #CAA54060) (sec. con núm. de ident.: 212)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea hookeriana</i> (GenBank #AAC72882) (sec. con núm. de ident.: 202)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea calophylla subsp. mesostemon</i> (GenBank #ABB71581) (sec. con núm. de ident.: 213)
35	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea lanceolata</i> (GenBank #CAC19933)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Elaeis guineensis</i> (GenBank #AAL15645) (sec. con núm. de ident.: 206)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea hookeriana</i> (GenBank #Q39513)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Gossypium hirsutum</i> (GenBank #AAD01982) (sec. con núm. de ident.: 214)
40	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Vitis vinifera</i> (GenBank #CAN81819) (sec. con núm. de ident.: 215)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Garcinia mangostana</i> (GenBank #AAB51525)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Brassica juncea</i> (GenBank #AB118986) (sec. con núm. de ident.: 216)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Madhuca longifolia</i> (GenBank #AAX51637) (sec. con núm. de ident.: 217)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Brassica napus</i> (GenBank #ABH11710)
45	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Oryza sativa</i> (grupo cultivar indica) (GenBank #EAY86877) (sec. con núm. de ident.: 218)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Oryza sativa</i> (grupo cultivar japónica) (GenBank #NP_001068400) (sec. con núm. de ident.: 219)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Oryza sativa</i> (grupo cultivar indica) (GenBank #EAY99617) (sec. con núm. de ident.: 220)
50	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea hookeriana</i> (GenBank #AAC49269)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Ulmus Americana</i> (GenBank #AAB71731)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea lanceolata</i> (GenBank #CAB60830) (sec. con núm. de ident.: 221)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea palustris</i> (GenBank #AAC49180)
55	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Iris germanica</i> (GenBank #AAG43858)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Iris germanica</i> (GenBank #AAG43858.1)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea palustris</i> (GenBank #AAC49179)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Myristica fragrans</i> (GenBank# AAB71729)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Myristica fragrans</i> (GenBank# AAB717291.1 )
60	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea hookeriana</i> (GenBank #U39834) (sec. con núm. de ident.: 197)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Umbellularia californica</i> (GenBank # M94159) (sec. con núm. de ident.: 285)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cinnamomum camphora</i> (GenBank #U31813) (sec. con núm. de ident.: 223)
	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Cuphea wrightii</i> (GenBank #U56103) (sec. con núm. de ident.: 183)
65	acil graso-ACP tioesterasa de <i>Ricinus communis</i> (GenBank #ABS30422) (sec. con núm. de ident.: 198)

Los ejemplos más abajo describen la direccionalidad y expresión exitosa de acil graso-ACP tioesterasas heterólogas de *Cuphea hookeriana*, *Umbellularia californica*, *Cinnamomun camphora*, *Cuphea palustris*, *Cuphea lanceolata*, *Iris germanica*, *Myristica fragrans* y *Ulmus americana* en especies de *Prototheca*. Adicionalmente, las alteraciones en el perfil de ácidos grasos se confirmaron en la expresión de las células hospedadoras de estas acil graso ACP tioesterasas heterólogas. Estos resultados fueron inesperados dada la falta de identidad de secuencia entre las tioesterasas de algas y de plantas superiores en general, y entre las acil graso ACP tioesterasas de *Prototheca moriformis* y las acil graso ACP tioesterasas heterólogas enumeradas arriba. Como se muestra en los Ejemplos, la expresión de estas tioesterasas heterólogas en *Prototheca* genera una microalga transgénica que es capaz de producir aceite/lípidos con perfiles de ácido graso verdaderamente únicos que actualmente no se encuentran disponibles a partir de cultivos de semillas comerciales, aun a través del mezclado de varios aceites de cultivo de semillas. La Tabla 5 muestra los perfiles de ácido graso de aceites de semillas comerciales comunes. Todos los datos de los aceites de semillas comerciales más abajo se compilaron de los Códigos de Alimentos y Productos Químicos de la Farmacopea de Estados Unidos, 7<sup>ma</sup> Ed. 2010-2011. Los datos del sebo son del Consejo Nacional de Investigación: Contenido de grasa y composición de los productos animales (1976).

Tabla 5. Perfiles de lípidos de aceites de semillas comerciales (en porcentajes).

		C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:0- diOH	C18:1- OH	C18:2	C18:3 □
20	<i>R. communis</i> (Aceite de ricino)	0	0	0	0	0.9-1.6	1.0-1.8	3.7-6.7	0.4-1.3	83.6-89.0	0	0.2-0.6
25	<i>C. nucifera</i> (Aceite de nuez de coco)	5.0-9.0	4.0-8.0	44-52	15-21	8.0-11.0	1.0-4.0	5.0-8.0	0	0	0-2.5	0
30	<i>Z. mays</i> (Aceite de maíz)	0	0	0	< 1.0	8.0-19.0	0.5-4.0	19-50	0	0	38-65	< 2.0
35	<i>G. barbadense</i> (Aceite de semilla de algodón)	0	0	< 0.1	0.5-2.0	17-29	1.0-4.0	13-44	0	0	40-63	0.1-2.1
40	<i>B. rapa, B. napus, B. juncea</i> (Canola)	0	0	< 0.1	< 0.2	< 6.0	< 2.5	>50	0	0	< 40	< 14
45	<i>O. europea</i> (Olivo)	0	0	0	< 0.1	6.5-20.0	0.5-5.0	56-85	0	0	3.5-20.0	< 1.2
50	<i>A. hypogaea</i> (Cacahuete)	0	0	< 0.1	< 0.2	7.0-16.0	1.3-6.5	35-72	0	0	13.0-43	< 0.6
55	<i>E. guineensis</i> (Almendra de palma)	3.0-5.0	2.5-6.0	40-52	14.0-18.0	7.0-10.0	1.0-3.0	11.0-19.0	0	0	0.5-4.0	0
60	<i>E. guineensis</i> (Palma)	0	0	0	0.5-5.9	32.0-47.0	2.0-8.0	34-44	0	0	7.2-12.0	0
65	<i>C. tinctorus</i> (Cártamo)	0	0	< 0.1	< 0.1	2.0-10.0	1.0-10.0	7.0-16.0	0	0	72-81	< 1.5
	<i>H. annuus</i> (Girasol)	0	0	< 0.1	< 0.5	3.0-10.0	1.0-10.0	14-65	0	0	20-75	< 0.5
	<i>G. max</i> (Frijol de soya)	0	0	< 0.1	< 0.5	7.0-12.0	2.0-5.5	19-30	0	0	48-65	5.0-10.0
	<i>L. usitatissimum</i> (Solín-linaza)	0	0	< 0.1	< 0.5	2.0-9.0	2.0-5.0	8.0-60	0	0	40-80	< 5.0
	<i>B. parkii</i> (Semilla de karité)	0	0	0	0	3.8-4.1	41.2-56.8	34.0-46.9	0	0	3.7-6.5	0
	<i>Manteca de cacao</i>		0-1	0-1	0-4	22-30	24-37	29-38			0-3	
	<i>Sebo</i>				3-4	23-28	14-23	36-43			1-4	< 1
	<i>Lardo</i>				1-2	22-26	13-18	39-45			8-15	0.5-1.5

Como un ejemplo, ninguno de estos aceites de semillas comunes contienen altas cantidades de ácidos grasos C8 o C10, donde el aceite de coco y el aceite de almendra de palma son las mayores fuentes, pero ambas en una relación de 1:1 (C8:C10 ácidos grasos). Como se muestra en los ejemplos, la *Prototheca* transformada con la tioesterasa de preferencia C:8 de *Cuphea palustris* fue capaz de alcanzar no solo un nivel de ácido graso C8 por encima del 12%, sino además, la relación de ácidos grasos C8:C10 fue aproximadamente 5:1. Los cambios en los niveles de ácidos grasos son útiles para producir aceites que contienen un perfil de ácido graso adaptado para una variedad de aplicaciones comerciales. Además, cambios en las relaciones entre las diferentes longitudes de cadenas de ácidos grasos es algo que no está disponible comercialmente en aceites que no pasaron por procesos químicos aun más costosos (tales como la esterificación, destilación, fraccionamiento, y re-esterificación). Como otro ejemplo, el aceite de palma es el aceite de mayor contenido de ácidos grasos C16:0 (32-47%), pero el aceite de palma tiene muy pocos ácidos grasos C14:0. *Prototheca* que contiene la tioesterasa *U. americana* alcanza aproximadamente 33-38% de ácidos grasos C16:0 y aproximadamente 10-16% de ácidos grasos C14:0 (aproximadamente una relación 2:1 C16:0 a C14:0). Este perfil de ácidos grasos es inalcanzable a través del mezclado de aceites existentes a nivel comercial porque los aceites de semillas que son altos en ácidos grasos 16:0 usualmente no contienen muchos ácidos grasos 14:0.

Los ejemplos más abajo describen además, por primera vez, la direccionalidad y expresión exitosas de al menos dos acil graso-ACP tioesterasas en un clon. Las alteraciones en los perfiles de ácidos grasos se confirmaron en estos clones y en dependencia de cuales dos tioesterasas se co-expresaron en un clon, los perfiles de ácidos grasos se impactaron de diferente manera. Como un ejemplo, de la Tabla 5 anteriormente, ambos aceites de coco y aceite de almendra de palma tienen relaciones de C12:C14 de aproximadamente 3:1. Como se describe en los ejemplos más abajo, un transformante de *Prototheca* que contiene dos genes de tioesterasa heterólogos fue capaz de producir niveles de ácidos grasos C12:C14 a una relación de aproximadamente 5:1. El tipo de relación de ácidos grasos C12:C14 fue, hasta ahora, inalcanzable a niveles comerciales (es decir, a través del mezclado de aceites de semillas).

Otro aspecto novedoso de los aceites producidos por microalgas transgénicas es el grado de saturación de los ácidos grasos. El aceite de palma es actualmente la mayor fuente de aceite saturado, con un total de saturados a insaturados de 52% a 48%. Como se muestra en los ejemplos más abajo, *Prototheca* con tioesterasas heterólogas de *U. americana* y *C. camphora* alcanzaron niveles totales de saturación por encima del 60% en el aceite que produjeron. Además se muestra en los ejemplos más abajo que, *Prototheca* con tioesterasas heterólogas de *U. americana* alcanzó niveles totales de saturación por encima del 86% en el aceite que produjo.

Las acil graso-CoA/aldehído reductasas adecuadas para su uso con los microbios y métodos de la invención incluyen, sin limitarse a, los enumerados en la Tabla 6.

Tabla 6. Acil graso-CoA/aldehído reductasas enumeradas por los números de acceso al GenBank.

AAC45217, YP\_047869, BAB85476, YP\_001086217, YP\_580344, YP\_001280274, YP\_264583, YP\_436109, YP\_959769, ZP\_01736962, ZP\_01900335, ZP\_01892096, ZP\_01103974, ZP\_01915077, YP\_924106, YP\_130411, ZP\_01222731, YP\_550815, YP\_983712, YP\_001019688, YP\_524762, YP\_856798, ZP\_01115500, YP\_001141848, NP\_336047, NP\_216059, YP\_882409, YP\_706156, YP\_001136150, YP\_952365, ZP\_01221833, YP\_130076, NP\_567936, AAR88762, ABK28586, NP\_197634, CAD30694, NP\_001063962, BAD46254, NP\_001030809, EAZ10132, EAZ43639, EAZ07989, NP\_001062488, CAB88537, NP\_001052541, CAH66597, CAE02214, CAH66590, CAB88538, EAZ39844, AAZ06658, CAA68190, CAA52019, y BAC84377

Las acil graso-CoA reductasas adecuadas para su uso con los microbios y métodos de la invención incluyen, sin limitarse a, los enumerados en la Tabla 7.

Tabla 7. Acil graso-CoA reductasas enumeradas por los números de acceso al GenBank.

NP\_187805, ABO14927, NP\_001049083, CAN83375, NP\_191229, EAZ42242, EAZ06453, CAD30696, BAD31814, NP\_190040, AAD38039, CAD30692, CAN81280, NP\_197642, NP\_190041, AAL15288, y NP\_190042

Las aldehído graso decarbonilasas adecuadas para su uso con los microbios y métodos de la invención incluyen, sin limitarse a, las enumeradas en la Tabla 8.

Tabla 8. Aldehído graso decarbonilasas enumeradas por los números de acceso al GenBank.

NP\_850932, ABN07985, CAN60676, AAC23640, CAA65199, AAC24373, CAE03390, ABD28319, NP\_181306, EAZ31322, CAN63491, EAY94825, EAY86731, CAL55686, XP\_001420263, EAZ23849, NP\_200588, NP\_001063227, CAN83072, AAR90847, y AAR97643

Las combinaciones de acil graso ACP tioesterasas que se co-expresan de manera natural y las proteínas

portadoras de acilo son adecuadas para su uso con los microbios y métodos de la invención.

Los ejemplos adicionales de enzimas de modificación de lípido o hidrocarburo incluyen secuencias de aminácidos contenidas en, referenciadas en, o codificadas por las secuencias de ácido nucleico contenidas o referenciadas en, cualquiera de las siguientes patentes de Estados Unidos: 6,610,527; 6,451,576; 6,429,014; 6,342,380; 6,265,639; 6,194,185; 6,114,160; 6,083,731; 6,043,072 ; 5,994,114; 5,891,697; 5,871,988; 6,265,639, y descritas además en el GenBank con números de acceso: AAO18435; ZP\_00513891; Q38710; AAK60613; AAK60610; AAK60611; NP\_113747; CAB75874; AAK60612; AAF20201; BAA11024; AF205791; y CAA03710.

Otras enzimas en la ruta biosintética de los lípidos son además adecuadas para usar con microbios y métodos de la invención. Por ejemplo, las enzimas ceto acil-ACP sintasa (Kas) trabajan en conjunto con algunas de las enzimas enumeradas anteriormente en la ruta biosintética de lípidos. Hay diferentes clases de enzimas Kas: Kas I participa en etapas de condensación sucesivas entre las cadenas de acil ACP cada vez más crecientes y malonil-ACP. Kas II típicamente participa en la etapa de condensación final y lleva de C16:0-ACP a C18:0-ACP e incorpora malonil-ACP. Como tal, en plantas superiores y algunas especies/cepas de microalgas que sintetizan predominantemente ácidos grasos C16-C18:0 (y sus derivados insaturados), las enzimas Kas II interactúan con productos de genes *FatA* (acil-ACP tioesterasas).

Las acil-ACP tioesterasas son las terminadoras de la biosíntesis de ácidos grasos en las plantas superiores (y algunas especies de microalgas), y en la mayoría de estas especies de plantas, esto se lleva a cabo por miembros de la familia de genes *FatA*, cuyo papel es terminar la elongación en la etapa C16:0 a C18:0. En especies que sintetizan cadenas de ácidos grasos más cortas (tales como *Cuphea*, *Elaeis*, *Myristica*, o *Umbellularia*), un grupo diferente de acil-ACP tioesterasas codificadas por genes *FatB* llevan a cabo esta etapa de terminación (ver, por ejemplo, la región codificante optimizada por codón de *Cocos nucifera* *FatB3-B*, sec. con núm. de ident.: 189). La interacción entre enzimas Kas II y acil-ACP tioesterasas es importante para la elongación correcta de la cadena de ácido graso. Como una consecuencia, en especies de plantas superiores (y especies de microalgas) que evolucionaron genes *FatB* capaces de la biosíntesis de lípidos de cadenas más cortas, hay una co-evolución correspondiente de una clase adicional de genes Kas, denominados genes Kas IV. Los genes *KasIV* son responsables de la elongación de la longitud de cadena de un intervalo de tamaños específicos de ácidos grasos, 4-14 carbonos en longitud.

Otras enzimas adecuadas para su uso con los microbios y los métodos de la invención incluyen aquellas que tienen al menos el 70% de identidad de aminoácidos con una de las proteínas, que se listan en las Tablas 4, 6-8, y que exhiben la correspondiente actividad enzimática deseada (por ejemplo, la escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilo, la reducción de un acil-CoA a un aldehído o un alcohol, o la conversión de un aldehído a un alcano). En las realizaciones adicionales, la actividad enzimática está presente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con una de las secuencias que se describieron anteriormente, todas las cuales se incorporan por referencia en la presente como está completamente dispuesto.

Al seleccionar la combinación deseada de genes exógenos a expresarse, se puede adaptar el producto generado por el microbio, el cual se puede extraer de la biomasa acuosa. Por ejemplo, el microbio puede contener: (i) un gen exógeno que codifica una acil graso-ACP tioesterasa; y, opcionalmente, (ii) una proteína portadora de acilo co-expresada u otra proteína portadora de acilo que tiene afinidad por la acil graso-ACP tioesterasa (o viceversa), y, opcionalmente, (iii) un gen exógeno que codifica una acil graso-CoA/aldehído reductasa o una acil graso -CoA reductasa y, opcionalmente, (iv) un gen exógeno que codifica una aldehído graso reductasa o una aldehído graso decarbonilasa. El microbio, bajo las condiciones de cultivo que se describen en la presente, sintetiza un ácido graso unido a una ACP y la acil graso-ACP tioesterasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP para producir, mediante procesamiento enzimático adicional, una molécula de acil-CoA. Cuando está presente, el acil graso-CoA/aldehído reductasa cataliza la reducción de la acil-CoA a un alcohol. Del mismo modo, la acil graso-CoA reductasa, cuando está presente, cataliza la reducción de la acil-CoA a un aldehído. En aquellas realizaciones en las que un gen exógeno que codifica una acil graso-CoA reductasa está presente y se expresa para rendir un producto aldehído, una aldehído graso reductasa, codificada por el tercer gen exógeno, cataliza la reducción del aldehído a un alcohol. Del mismo modo, un aldehído graso decarbonilasa cataliza la conversión del aldehído a un alcano o un alqueno, cuando está presente.

En otro ejemplo, el microbio puede contener: (i) un gen exógeno que codifica una acil graso-ACP tioesterasa; (ii) opcionalmente, una proteína transportadora de acilo naturalmente co-expresada o una proteína transportadora de acilo que tiene afinidad por la acil ácido graso-ACP tioesterasa; (iii) un gen mutado de desaturasa endógeno, en donde la mutación hace al gen de desaturasa o la proteína desaturasa inactivos, tal como un knockout de desaturasa; (iv) la sobre expresión de una proteína transportadora estearoil acil desaturasa endógena o la expresión de una SAD heterólogo; y (v) cualquier combinación de los anteriores.

Los genes que codifican tales enzimas, tales como acil graso ACP tioesterasas, se pueden obtener de

células que ya se conoce que exhiben una producción de lípidos significativa, tal como *Chlorella protothecoides*. Los genes ya conocidos tienen un papel en la producción de lípido, por ejemplo, un gen que codifica una enzima que satura los dobles enlaces, se puede transformar de forma individual en las células receptoras. Sin embargo, en la práctica de la invención no es necesario hacer suposiciones *a priori* en cuanto a qué genes son necesarios. Los métodos para la identificación de genes que pueden alterar (mejorar) la producción de lípidos en las microalgas se describen en la publicación PCT núm. 2008/151149.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un microorganismo (*por ejemplo*, una célula *Prototheca*) que se modificó genéticamente para expresar una enzima de la vía de lípidos a un nivel alterado en comparación con una célula silvestre de la misma especie. En algunos casos, la célula produce más lípidos en comparación con la célula de tipo salvaje cuando ambas células se cultivan en las mismas condiciones. En algunos casos, la célula se modifica genéticamente y/o se selecciona para expresar una enzima de la vía de lípidos en un nivel más alto que el de las células de tipo salvaje. En algunos casos, la enzima de la vía de lípidos se selecciona del grupo que forman la piruvato deshidrogenasa, la acetil-CoA carboxilasa, la proteína portadora de acilo, y la glicerol-3 fosfato aciltransferasa. En algunos casos, la célula se modifica genéticamente y/o se selecciona para expresar una enzima de la vía de lípidos en un nivel inferior a la célula de tipo salvaje. En al menos una realización en la cual la célula expresa la enzima de la vía de lípidos en un nivel inferior, la enzima de la vía de lípidos comprende la citrato sintasa.

En algunos ejemplos, la célula se modifica genéticamente y/o se selecciona para expresar un regulador global de la síntesis de ácidos grasos en un nivel alterado en comparación con la célula de tipo salvaje, por lo que los niveles de expresión de una pluralidad de genes sintéticos de ácidos grasos están alterados en comparación con la célula de tipo salvaje. En algunos casos, la enzima de la vía de lípidos comprende una enzima que modifica un ácido graso. En algunos casos, la enzima de la vía de lípidos se selecciona de una estearoil-ACP desaturasa y una glicerolípido desaturasa. En algunos casos, la célula se modifica genéticamente y/o se selecciona para expresar un nivel más bajo de una enzima de una ruta de lípidos, o no expresar en lo absoluto una enzima específica de una ruta de lípidos (es decir, en donde una enzima de la ruta de lípidos es knockout, o se reemplaza con un gen exógeno).

Algunas microalgas producen cantidades significativas de metabolitos no lipídicos, tales como, por ejemplo, los polisacáridos. Debido a que la biosíntesis de polisacáridos puede usar una proporción significativa del total de la energía metabólica disponible para las células, la mutagénesis de las células que producen lípidos seguido por la detección de la producción de polisacárido reducida o eliminada genera nuevas cepas que son capaces de producir altos rendimientos de lípidos.

En otros ejemplos, la presente invención se dirige a un microbio productor de aceites que contiene uno o más genes exógenos, en donde los genes exógenos codifican la(s) proteína(s) seleccionadas del grupo consistente de una acil graso-ACP tioesterasa, una acil graso-CoA reductasa, una aldehído graso reductasa, una acil graso-CoA/aldehído reductasa, una aldehído graso decarboxilasa, una desaturasa, y una proteína portadora de acilo. En otra realización, un gen de desaturasa endógeno se sobreexpresa en un micro que contiene uno o más de los genes exógenos anteriores. En una realización, el gen exógeno está en unión operativa con un promotor, el cual es inducible o reprimible en respuesta a un estímulo. En algunos casos, el estímulo se selecciona del grupo que forman una molécula pequeña que se suministra exógenamente, el calor, el frío y nitrógeno limitado en el medio de cultivo. En algunos casos, el gen exógeno se expresa en un compartimento celular. En algunas realizaciones, el compartimento celular se selecciona del grupo consistente de un cloroplasto, un plastidio y una mitocondria. En algunas realizaciones el microbio es *Prototheca moriformis*, *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora* o *Prototheca zopfii*.

En un ejemplo, el gen exógeno codifica una ácido graso acil- ACP tioesterasa. En algunos casos, la tioesterasa que se codifica por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 carbonos de una proteína portadora de acilo (ACP). En algunos casos, la tioesterasa que se codifica por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 carbonos de una ACP. En una realización, la tioesterasa que se codifica por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 carbonos de una ACP.

En un ejemplo, el gen exógeno codifica una acil graso-CoA/aldehído reductasa. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil graso-CoA de 8 a 18 carbonos al alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil graso-CoA de 10 a 14 carbonos al alcohol primario correspondiente. En una realización, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de un acil graso-CoA de 12 carbonos a dodecanol.

La presente divulgación también proporciona una célula de *Prototheca* recombinante que contiene dos genes exógenos, en donde un primer gen exógeno codifica una acil-ACP tioesterasa y un segundo gen exógeno codifica una proteína que se selecciona del grupo que consiste de una acil-CoA reductasa, una acil graso-CoA/aldehído reductasa, y una proteína portadora de acilo. En algunos casos, los dos genes exógenos están cada uno en un enlace operable con un promotor, el cual se induce en respuesta a un estímulo. En algunos casos, cada promotor es inducible en respuesta a un estímulo idéntico, tal como nitrógeno limitado o nulo en el medio de cultivo. La limitación o ausencia total de nitrógeno en el medio de cultivo estimula la producción de aceite en algunos

microorganismos, tales como la especie *Prototheca*, y se puede usar como un disparador para inducir la producción de aceite a altos niveles. Cuando se usa en combinación con los métodos de ingeniería genética descritos en la presente, el lípido como un porcentaje del peso seco de las células se puede llevar a altos niveles tales como al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70% y al menos 75%; los métodos descritos en la presente proporcionan células con esos niveles de lípidos, en donde el lípido es al menos 1%-5%, preferentemente al menos 4%, C8-C14, al menos 0.25%-1%, preferentemente al menos 0.3%, C8, al menos 1%-5%, preferentemente al menos 2%, C10, al menos 1%-5%, preferentemente al menos 2%, C12, y al menos 1%-5%, preferentemente al menos 2%, C14. En algunas realizaciones las células están por encima de 10%, por encima de 15%, por encima de 20%, o por encima de 25% de lípidos por peso seca de la célula y contiene lípido que es al menos 5%, al menos 10% o al menos 15% C8-C14, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25% o al menos 30% C8-C14, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35% o al menos 40%, C8-C14, 5%-40%, preferentemente 10-30%, C8-C14 y 10%-40%, preferentemente 20-30%, C8-C14.

Los aceites que se describen en la presente son distintos de otros aceites de origen natural con alto contenido de ácidos grasos de media cadena, tales como el aceite de palma, aceite de almendra de palma y aceite de coco. Por ejemplo, los niveles de contaminantes tales como los carotenoides son mucho más altos en el aceite de palma y el aceite de almendra de palma que en los aceites de la invención. Los aceites de palma y de almendra de palma, en particular, contienen alfa y beta carotenos y licopeno en cantidades mucho más altas que las que hay en los aceites de la invención. Además, se encuentran más de 20 carotenoides diferentes en el aceite de almendra de palma y palma, mientras que los Ejemplos demuestran que los aceites de la invención contienen muy pocas especies de carotenoides y niveles muy bajos. Adicionalmente, los niveles de los compuestos de vitamina E tales como tocotrienoles son mucho más altos en los aceites de palma, almendra de palma y de coco que en los aceites de la invención.

En un ejemplo, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 carbonos de una ACP. En algunas realizaciones, el segundo gen exógeno codifica una acil graso-CoA/aldehído reductasa que cataliza la reducción de un acil graso-CoA de 8 a 18 carbonos a un alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 de carbono de una ACP, y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil graso-CoA de 10 a 14 carbono al correspondiente alcohol primario, en donde la tioesterasa y la reductasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono. En una realización, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 12 carbonos de una ACP, y la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil graso-CoA de 12 carbonos a dodecanol. En algunas realizaciones, el segundo gen exógeno codifica una acil graso-CoA reductasa que cataliza la reducción de un acil graso-CoA de 8 a 18 carbonos a un aldehído correspondiente. En algunas realizaciones, el segundo gen exógeno codifica una proteína transportadora de acilo que se co-expresa naturalmente con la acil graso-ACP tioesterasa.

En algunos ejemplos, el segundo gen exógeno codifica para una acil-CoA reductasa, y el microbio contiene además un tercer gen exógeno que codifica una aldehído graso decarbonilasa. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el primer gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 carbonos de una ACP, la reductasa codificada por el segundo gen exógeno cataliza la reducción de un acil graso-CoA de 8 a 18 carbonos a un aldehído graso correspondiente, y la decarbonilasa codificada por el tercer gen exógeno cataliza la conversión de un aldehído graso de 8 a 18 carbonos a un alcano correspondiente, en donde la tioesterasa, la reductasa, y la decarbonilasa actúan sobre la misma longitud de cadena de carbono.

En algunos ejemplos, el segundo gen exógeno codifica una proteína portadora de acilo, y el microbio contiene además un tercer gen exógeno que codifica una proteína seleccionada del grupo consistente de una acil-CoA reductasa y una acil graso-CoA/aldehído reductasa. En algunos casos, el tercer gen exógeno codifica una acil graso-CoA reductasa, y el microbio contiene además un cuarto gen exógeno adicional que codifica una aldehído graso decarbonilasa.

La presente divulgación también proporciona métodos para producir un alcohol que comprende el cultivo de una población de microorganismos recombinantes (*por ejemplo*, células de *Prototheca*) en un medio de cultivo, en donde las células contienen (i) un primer gen exógeno que codifica una acil graso-ACP tioesterasa, y (ii) un segundo gen exógeno que codifica una acil graso-CoA/aldehído reductasa, y las células sintetizan un ácido graso vinculado a una proteína portadora de acilo (ACP), la acil graso-ACP tioesterasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP para producir, a través de la transformación posterior, una acil graso-CoA, y la acilo graso-CoA/aldehído reductasa cataliza la reducción de la acil-CoA a un alcohol.

La presente divulgación además proporciona métodos para producir una molécula de lípido en un microorganismo (*por ejemplo*, una célula de *Prototheca*). En una realización, el método comprende cultivar una población de células *Prototheca* en un medio de cultivo, en donde las células contienen (i) un primer gen exógeno que codifica una acil-ACP tioesterasa, y (ii) un segundo gen exógeno que codifica un acilo graso-CoA reductasa, y en donde los microbios sintetizan un ácido graso vinculado a una proteína portadora de acilo (ACP), la acil-ACP tioesterasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP para producir, a través de la transformación posterior, acil

graso-CoA reductasa, y la acil graso-CoA reductasa cataliza la reducción de la acil-CoA a un aldehído.

La presente divulgación también proporciona métodos para producir una molécula de ácido graso que tiene una longitud de cadena de carbono especificada en un microorganismo (*por ejemplo*, una célula de *Prototheca*). En una realización, el método comprende cultivar una población de células *Prototheca* que produce lípidos en un medio de cultivo, en donde los microbios contienen un gen exógeno que codifica una acil graso-ACP tioesterasa, que tiene una actividad específica o preferencial por cierta longitud de cadena de carbono, tal como 8, 10, 12 o 14 átomos de carbono, y en donde los microbios sintetizan un ácido graso unido a una proteína portadora de acilo (ACP) y la tioesterasa cataliza la escisión del ácido graso de la ACP cuando el ácido graso se sintetizó a la longitud específica de la cadena de carbono.

En los varios ejemplos descritos anteriormente, el microorganismo (*por ejemplo*, una célula de *Prototheca*) puede contener al menos un gen exógeno que codifica una enzima de la ruta de los lípidos. En algunos casos, la enzima de la vía de los lípidos se selecciona del grupo que consiste en una esteroil ACP desaturasa, una glicerolípido desaturasa, una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína portadora de acilo, y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa. En otros casos, la, el microorganismo (*por ejemplo*, la célula de *Prototheca*) contiene una enzima de modificación de lípidos seleccionada del grupo que consiste de una acil graso-ACP tioesterasa, una acil graso-CoA/aldehído reductasa, una acil graso-CoA reductasa, una aldehído graso reductasa, una aldehído graso decarbonilasa, y/o una proteína portadora de acilo.

Un número de casetes o constructos de transformación ilustrativos que se usan para expresar una variedad de enzimas de la ruta de los lípidos y enzimas de modificación de lípidos que se discuten en la presente descripción se presentan en los Ejemplos. Otros constructos útiles, sin limitación, se enumeran en la Tabla 37, más abajo.

Tabla 37. Constructos de transformación ilustrativos, regiones codificantes optimizadas por codón, y enzimas.

<b>Constructo de transformación/Región codificante/Enzima</b>	<b>sec. con núm. de ident.</b>
constructo de tioesterasa específica C10:0 de <i>C. hookeriana</i>	243
región codificante para <i>C. hookeriana</i> C10:0 tioesterasa específica (optimizada por codón)	244
constructo de la enzima KAS IV de <i>C. hookeriana</i>	245
región codificante para <i>C. hookeriana</i> la enzima KAS IV (optimizada por codón)	246
enzima KAS IV de <i>C. hookeriana</i>	247
tioesterasa específica C10:0 de <i>C. hookeriana</i> más constructo de la enzima KAS IV de <i>C. hookeriana</i>	248
región codificante para <i>C. lanceolata</i> C10:0 tioesterasa específica con desaturasa de ácido graso UTEX 1435 □12	249
constructo de tioesterasa específica C12:0 de <i>U. californica</i>	250
región codificante para <i>U. californica</i> C12:0 tioesterasa específica (optimizada por codón)	251
constructo de tioesterasa C16:0 de <i>G. mangostana</i>	252
región codificante para <i>G. mangostana</i> C16:0 tioesterasa (optimizada por codón)	253
constructo de tioesterasa C18:0 de <i>B. napus</i>	254
región codificante para <i>B. napus</i> C18:0 tioesterasa (optimizada por codón)	255
constructo de esteroil-ACP desaturasa de <i>O. europaea</i>	256
región codificante para <i>O. europaea</i> esteroil-ACP desaturasa (optimizada por codón)	257
constructo de tioesterasa C16:0 de <i>C. hookeriana</i>	258
región codificante para <i>C. hookeriana</i> C16:0 tioesterasa (optimizada por codón)	259
constructo de tioesterasa C16:0 de <i>E. guineensis</i>	260
región codificante para <i>E. guineensis</i> C16:0 tioesterasa (optimizada por codón)	261
ACP-tioesterasa de <i>C. tinctorius</i> en el constructo del locus de desaturasa de ácido graso □12	262
región codificante para <i>C. tinctorius</i> ACP-tioesterasa (optimizada por codón)	263
constructo de tioesterasa de amplia especificidad C14:0-C18:0 de <i>M. fragrans</i>	264
región codificante para <i>M. fragrans</i> C14:0-C18:0 tioesterasa de amplia especificidad (optimizada por codón)	265
región codificante para tioesterasa específica C:14:0 de <i>M. fragrans</i>	266
tioesterasa específica C14:0 de <i>M. fragrans</i> con el péptido de tránsito □12 FAD	267
constructo ACP-tioesterasa de <i>Ricinus communis</i>	268
región codificante para ACP-tioesterasa de <i>Ricinus communis</i> (optimizada por codón)	269
constructo de tioesterasa C14:0 de <i>C. camphora</i>	270
región codificante para tioesterasa C14:0 de <i>C. camphora</i> (optimizada por codón)	271
constructo de tioesterasa específica C14:0 de <i>C. camphora</i>	272
constructo de tioesterasa específica C14:0 de <i>C. camphora</i>	273

(continuación)

	<b>Constructo de transformación/Región codificante/Enzima</b>	<b>sec. con núm. de ident.</b>
5	tiesterasa específica C10:0-C16:0 de <i>U. Americana</i> en un locus SAD	274
	región codificante para tiesterasa específica C10:0-C16:0 de <i>U. Americana</i> (optimizada por codón)	275
	<i>C. wrightii</i> KASA1 + <i>C. wrightii</i> FatB2 tiesterasa + constructo suc2	276
10	región codificante para <i>C. wrightii</i> KASA1 (optimizada por codón)	277
	región codificante para tiesterasa FatB2 de <i>C. wrightii</i> (optimizada por codón)	278

## VI. COMBUSTIBLES Y PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS

15 Para la producción de combustible de acuerdo con los métodos de la invención, se recolectan los lípidos producidos por las células de la invención, o se recogen de otra manera, por cualquier medio conveniente. Los lípidos se pueden aislar por extracción de las células completas. Primero las células se rompen, y después los lípidos intracelulares y asociados a la membrana/pared celulares así como los hidrocarburos extracelulares se pueden separar de la masa celular, tal como mediante el uso de centrifugación como se describió anteriormente. Los lípidos intracelulares que se producen en microorganismos, en algunas realizaciones, se extraen después de lisar la célula del microorganismo. Una vez extraídos, los lípidos se refinan posteriormente para producir aceites, combustibles o productos oleoquímicos.

20 Después del completamiento del cultivo, los microorganismos se pueden separar del caldo de fermentación. Opcionalmente, la separación se efectúa por centrifugación para generar una pasta concentrada. La centrifugación no elimina las cantidades significativas de agua intracelular proveniente de los microorganismos y no es una etapa de secado. La biomasa se puede lavar opcionalmente con una solución de lavado (por ejemplo, agua DI) para deshacerse del caldo de fermentación y los residuos celulares. Opcionalmente, la biomasa microbiana lavada también se puede secar (secado en el horno, liofilizada, etc.) antes de la ruptura celular. Por otra parte, las células se pueden lisar sin separación de parte o todo el caldo de fermentación, cuando se completa la fermentación. Por ejemplo, las células pueden estar en una proporción de menos de 1:1, v:v de células con respecto al líquido extracelular cuando ellas se lisan.

25 Los microorganismos que contiene un lípido se pueden lisar para producir un lisado. Como se detalla en la presente, la etapa de lisar un microorganismo (también conocida como lisis celular) se puede lograr por cualquier medio conveniente, incluyendo lisis inducida por calor, adición de una base, adición de un ácido, uso de enzimas como las proteasas y enzimas de degradación de polisacáridos tales como las amilasas, usando ultrasonido, lisis mecánica, usando choque osmótico, infección con un virus lítico, y/o expresión de uno o más genes líticos. La lisis se realiza para liberar las moléculas intracelulares que se han producido por el microorganismo. Cada uno de estos métodos para la lisis de un microorganismo se puede usar como un método único o en combinación simultánea o secuencial. La magnitud de la ruptura celular se puede observar por análisis microscópico. Usando uno o varios de los métodos descritos en la presente, se observa típicamente más del 70% de ruptura celular. Preferentemente la ruptura celular es más del 80%, más preferentemente es más del 90% y de mayor preferencia de un 100%.

30 En realizaciones particulares, el microorganismo se lisa después del crecimiento, por ejemplo para incrementar la exposición del lípido celular y/o el hidrocarburo a la extracción o procesamiento posterior. El momento de la expresión de la lipasa (por ejemplo, a través de un promotor inducible) o de la lisis celular, se pueden ajustar para optimizar el rendimiento de los lípidos y/o hidrocarburos. A continuación se describen una serie de técnicas de lisis. Estas técnicas se pueden usar individualmente o en combinación.

35 En una realización de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende el calentamiento de una suspensión celular que contiene el microorganismo. En esta realización, el caldo de fermentación que contiene los microorganismos (o una suspensión de microorganismos aislados a partir del caldo de fermentación) se calienta hasta que los microorganismos, es decir, las paredes celulares y las membranas de los microorganismos se degraden o se rompan. Típicamente, las temperaturas aplicadas son al menos 50°C. Temperaturas más altas, tales como, al menos 30°C al menos 60°C, al menos 70°C, al menos 80°C, al menos 90°C, al menos 100°C, al menos 110°C, al menos 120°C, al menos 130°C o superiores se usan para una lisis celular más eficiente. El lisado de las células mediante tratamiento térmico se puede realizar hirviendo al microorganismo. Alternativamente, el tratamiento térmico (sin hervir) se puede realizar en una autoclave. El lisado tratado térmicamente se puede enfriar para su posterior tratamiento. La ruptura celular también se puede realizar por tratamiento con vapor, es decir, mediante la adición de vapor a presión. El tratamiento con vapor de las microalgas para la ruptura celular se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos núm. 6,750,048. En algunas realizaciones, el tratamiento con vapor se puede lograr por aspersión de vapor en el fermentador y mantenimiento del caldo de cultivo a una temperatura deseada por menos de aproximadamente 90 minutos preferentemente menos de aproximadamente 60 minutos y con mayor preferencia menos de aproximadamente 30 minutos.

5 En otra realización de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende la adición de una base a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La base debe ser lo suficientemente fuerte para hidrolizar al menos una porción de los compuestos proteicos de los microorganismos usados. Las bases que son útiles para solubilizar las proteínas se conocen en la materia de la química. Las bases ejemplares que son útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de litio, sodio, potasio, calcio y mezclas de los mismos. Una base preferida es el KOH. El tratamiento con base de las microalgas para la ruptura celular se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos núm. 6,750,048.

10 En otra realización de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende la adición de un ácido a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La lisis ácida se puede llevar a cabo usando un ácido a una concentración de 10 a 500 mM o preferentemente de 40 a 160 nM. La lisis ácida se lleva a cabo preferentemente por encima de la temperatura ambiente (por ejemplo, a 40-160°, y preferentemente a temperatura de 50-130°. Para temperaturas moderadas (por ejemplo, temperatura ambiente a 100°C y particularmente  
15 temperatura ambiente a 65°, el tratamiento ácido se puede combinar útilmente con sonicación u otros métodos de ruptura celular.

20 En otra realización de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende la lisis del microorganismo mediante el uso de una enzima. Las enzimas preferidas para la lisis de un microorganismo son las proteasas y las enzimas degradantes de polisacáridos tales como la hemicelulasa (por ejemplo, hemicelulasa de *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #H2125), pectinasa (por ejemplo, pectinasa de *Rhizopus sp.*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #P2401), Mannaway 4.0 L (Novozymes), celulasa (por ejemplo, celulosa de *Trichoderma viride*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #C9422), y driselasa (por ejemplo, driselasa de *Basidiomycetes sp.*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #D9515).

25 En otras realizaciones de la invención, la lisis se lleva a cabo usando una enzima, tal como, por ejemplo, una celulasa tal como una enzima de degradación de polisacáridos, opcionalmente proveniente de *Chlorella* o un virus de *Chlorella*, o una proteasa, tal como la proteasa de *Streptomyces griseus*, quimotripsina, proteinasa K, las proteasas que se listan en Degradation of Polylactide by Commercial Proteases, Oda Y. y otros., Journal of Polymers and the Environment, Volumen 8, número 1, enero 2000, pp. 29-32(4), Alcalase 2.4 FG (Novozymes), y Flavourzyme 100 L (Novozymes). Cualquier combinación de una proteasa y una enzima que degrada polisacáridos también se puede utilizar, incluyendo cualquier combinación de las proteasas y las enzimas que degradan polisacáridos anteriores.

30 En otra realización, la lisis se puede realizar usando una prensa expulsora. En este proceso, la biomasa se fuerza a pasar a través de un dispositivo de tipo rosca a alta presión, lisando las células y causando que los lípidos intracelulares se liberen y se separen de la proteína y la fibra (y los otros componentes) en la célula.

35 En otra realización de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo se realiza mediante ultrasonido, es decir, sonicación. De esta manera, las células pueden también lisarse con sonido de alta frecuencia. El sonido se puede producir por vía electrónica y se transporta a través de una punta metálica a una suspensión celular apropiadamente concentrada. Esta sonicación (o ultrasonicación) altera la integridad celular basada en la formación de cavidades en la suspensión celular.

40 En otra realización de la presente invención, la etapa lisis de un microorganismo se lleva a cabo por lisis mecánica. Las células se pueden lisar mecánicamente y, opcionalmente, homogeneizarse para facilitar la recolección de los hidrocarburos (por ejemplo, los lípidos). Por ejemplo, un disruptor de presión se puede utilizar para bombear una mezcla que contiene las células a través de una válvula de orificio restringido. Se aplica alta presión (hasta 1500 bar), seguido por una expansión instantánea a través de una boquilla de salida. La ruptura celular se lleva a cabo por tres mecanismos diferentes: impacto en la válvula, alta cizalla del líquido en el orificio, y la repentina caída de presión después de la descarga, causando una explosión de la célula. El método libera las moléculas intracelulares. Alternativamente se puede usar un molino de bolas. En un molino de bolas, las células se agitan en suspensión con pequeñas partículas abrasivas, tales como gránulos. Las células se rompen debido a las fuerzas de cizalla, el molido entre los gránulos, y las colisiones con los gránulos. Los gránulos rompen las células para liberar los contenidos celulares. Las células también se pueden romper por las fuerzas de cizalla, tal como con el uso de mezclado (tal como con una licuadora de alta velocidad o Waring como ejemplos), prensa francesa, o incluso centrifugación en el caso de paredes celulares débiles, para romper las células.

45 En otra realización de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo se realiza mediante la aplicación de un choque osmótico.

50 En otra realización de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende la infección del microorganismo con un virus lítico. Una amplia variedad de virus se conocen por lisar microorganismos adecuados para el uso en la presente invención, y la selección y uso de un virus lítico en particular para un microorganismo en particular se encuentra dentro del nivel de experiencia en la técnica. Por ejemplo, el virus  
55

*paramecium bursaria chlorella* (PBCV-1) es el prototipo de un grupo (familia Phycodnaviridae, género Chlorovirus) de los virus de doble cadena de ADN, grandes, icosaédricos, que forman placa, que se replican en, y lisan, ciertas algas verdes similares a *chlorella*, unicelulares, eucariotas. En consecuencia, cualquier microalgas sensible se puede lisar mediante infección del cultivo con un virus de *chlorella* adecuado. Se conocen los métodos de infectar las especies de *Chlorella* con un virus de *chlorella*. Ver, por ejemplo, *Adv. Virus Res.* 2006; 66: 293-336; *Virology*, 1999 abr 25; 257(1):15-23; *Virology*, 2004 ene 5; 318(1): 214-23; *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2000;(44):161-2; *J. Virol.* 2006 Mar;80(5):2437-44; y *Annu. Rev. Microbiol.* 1999;53:447-94.

En otra realización de la presente invención, la etapa de lisis de un microorganismo comprende la autólisis. En esta realización, un microorganismo de la invención se modifica por ingeniería genética para producir una proteína lítica que lisa al microorganismo. Este gen lítico se puede expresar con un promotor inducible, por lo que las células primero se pueden crecer a una densidad deseable en un fermentador, seguido por la inducción del promotor para expresar el gen lítico para lisar las células. En una realización, el gen lítico codifica una degradante del polisacárido. En otras ciertas realizaciones, el gen lítico es un gen de un virus lítico. Así, por ejemplo, un gen lítico de un virus de *Chlorella* puede expresarse en una célula de algas; ver *Virology* 260, 308-315 (1999); *FEMS Microbiology Letters* 180 (1999) 45-53; *Virology* 263, 376-387 (1999); y *Virology* 230, 361-368 (1997). La expresión de los genes líticos se realiza de preferencia usando un promotor inducible, tal como un promotor activo en microalgas que se induce mediante un estímulo, tal como la presencia de una molécula pequeña, luz, calor, y otros estímulos.

Existen varios métodos para separar los lípidos a partir de los lisados celulares producidos por los métodos anteriores. Por ejemplo, los lípidos y los derivados de los lípidos, tales como aldehídos grasos, alcoholes grasos, y los hidrocarburos, tales como los alcanos, se pueden extraer con un solvente hidrofóbico como el hexano (ver Frenz y otros, 1989, *Enzyme Microb. Technol.*, 11:717). Los derivados de los lípidos y los lípidos también se pueden extraer usando licuefacción (ver, por ejemplo, Sawayama y otros, 1999, *Biomass and Bioenergy* 17:33-39 e Inoe y otros, 1993, *Biomass Bioenergy* 6 (4): 269-274); licuefacción de petróleo (ver, por ejemplo, Minowa y otros., 1995, *Fuel* 74 (12): 1735-1738); y extracción de CO<sub>2</sub> supercrítico (ver, por ejemplo, Mendes y otros, 2003, *Inorganica Chimica Acta* 356: 328-334). Miao y Wu describen un protocolo de recuperación de lípidos de microalgas a partir de un cultivo de *Chlorella protothecoides*, en cual las células se recolectaron por centrifugación, se lavaron con agua destilada y se secaron mediante liofilización. El polvo de las células resultante se pulverizó en un mortero y entonces se extrajeron con *n*-hexano (Miao y Wu, *Biosource Technology* (2006) 97: 841-846).

De esta manera, los lípidos, derivados de lípidos e hidrocarburos generados por los microorganismos de la presente invención se pueden recuperar mediante extracción con un solvente orgánico. En algunos casos, el solvente orgánico preferido es hexano. Típicamente, el solvente orgánico se añade directamente al lisado sin separación previa de los componentes del lisado. En una realización el lisado generado por uno o varios de los métodos descritos anteriormente se pone en contacto con un solvente orgánico por un período de tiempo suficiente para permitir que los lípidos y/o los componentes hidrocarburos formen una solución con el solvente orgánico. En algunos casos, la solución puede refinarse adicionalmente para recuperar los lípidos o los componentes de los hidrocarburos específicos deseados. Los métodos de extracción con hexano son bien conocidos en la técnica.

Los lípidos y derivados de lípidos, tales como aldehídos grasos, alcoholes grasos, y los hidrocarburos, tales como los alcanos producidos por las células, como se describe en la presente, pueden modificarse mediante el uso de una o más enzimas, incluyendo una lipasa, como se describe anteriormente. Cuando los hidrocarburos se encuentran en el ambiente extracelular de las células, una o más enzimas se pueden añadir a ese ambiente bajo condiciones en las cuales la enzima modifica el hidrocarburo o completa su síntesis a partir de un precursor del hidrocarburo. Alternativamente, los hidrocarburos se pueden aislar parcialmente o completamente del material celular antes de la adición de uno o más catalizadores tales como las enzimas. Estos catalizadores se agregan exógenamente, y su actividad ocurre fuera de la célula o *in vitro*.

De esta manera, los lípidos y los hidrocarburos producidos por las células *in vivo* o modificados enzimáticamente *in vitro*, tal como se describe en la presente, pueden opcionalmente procesarse por medios convencionales. El procesamiento puede incluir "craqueo" (descomposición molecular) para reducir el tamaño, y por lo tanto incrementar la proporción de hidrógeno:carbono de las moléculas de hidrocarburos. Los métodos de craqueo catalítico y térmico se usan rutinariamente en el procesamiento de los hidrocarburos y de los aceites de triglicéridos. Los métodos catalíticos involucran el uso de un catalizador, tal como un catalizador ácido sólido. El catalizador puede ser de sílice-alúmina o una zeolita, los cuales resultan en la ruptura heterolítica o asimétrica, de un enlace carbono-carbono para resultar en un carbocatión y un anión hidruro. Estos intermediarios reactivos entonces sufren ya bien o un reordenamiento o la transferencia del hidruro con otro hidrocarburo. Las reacciones, por lo tanto, pueden regenerar los intermediarios para dar lugar a un mecanismo de cadena auto-multiplicativa. Los hidrocarburos también pueden procesarse para reducir, opcionalmente a cero, el número de dobles enlaces o triples carbono-carbono de los mismos. Los hidrocarburos también pueden procesarse para quitar o eliminar un anillo o estructura cíclica en ellos. Los hidrocarburos también pueden procesarse para aumentar la proporción de hidrógeno:carbono. Esto puede incluir la adición de hidrógeno (hidrogenación) y/o el "craqueo" de los hidrocarburos en otros hidrocarburos más pequeños.

5 Los métodos térmicos involucran el uso de temperatura y presión elevadas para reducir el tamaño del hidrocarburo. Se pueden utilizar una temperatura elevada de aproximadamente 800°C y una presión de aproximadamente 700kPa. Estas condiciones generan "luz", un término que se usa a veces para referirse a las moléculas de hidrocarburos ricas en hidrógeno (a diferencia de las del flujo de fotones), mientras generan además, por condensación, moléculas de hidrocarburos más pesadas las cuales carecen relativamente de hidrógeno. La metodología proporciona la ruptura homolítica o simétrica, y produce alquenos que pueden saturarse enzimáticamente de forma opcional, como se describe anteriormente.

10 Los métodos catalíticos y térmicos son estándares en las plantas de procesamiento de hidrocarburos y refinación de petróleo. De esta manera, los hidrocarburos que se producen por las células, como se describe en la presente, pueden recolectarse y procesarse o refinarse a través de medios convencionales. Ver Hillen y otros, (Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIV:193-205 (1982)) para un informe sobre hidrocrackeo de hidrocarburos producidos por microalgas. En realizaciones alternativas, la fracción se trata con otro catalizador, tal como un compuesto orgánico, calor y/o un compuesto inorgánico. Para el procesamiento de los lípidos en biodiesel, se usa un proceso de transesterificación como se describe más abajo en esta Sección.

20 Los hidrocarburos producidos a través de los métodos de la presente invención, son útiles en una variedad de aplicaciones industriales. Por ejemplo, la producción de sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS), un surfactante aniónico utilizado en casi todos los tipos de detergentes y productos de limpieza, utiliza los hidrocarburos que comprenden generalmente una cadena de 10-14 átomos de carbono. Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms.: 6,946,430; 5,506,201; 6,692,730; 6,268,517; 6,020,509; 6,140,302; 5,080,848; y 5,567,359. Los surfactantes tales como LAS, se pueden usar en la fabricación de composiciones para el cuidado personal y detergentes tales como los descritos en las patentes de los Estados Unidos núms.: 5,942,479; 6,086,903; 5,833,999; 6,468,955; y 6,407,044.

30 Un interés creciente se dirige al uso de los componentes de los hidrocarburos de origen biológico en los combustibles, tales como biodiesel, diesel renovable y combustible de reactor, ya que las materias primas biológicas renovables pueden sustituir a las materias primas derivadas de los combustibles fósiles que están disponibles, y su uso, por lo tanto, es deseable. Existe una necesidad urgente de métodos para la producción de componentes de hidrocarburos a partir de materiales biológicos. La presente invención satisface esta necesidad al proporcionar métodos para la producción de biodiesel, diesel renovable y combustible de reactor usando los lípidos generados por los métodos descritos en la presente como un material biológico para producir biodiesel, diesel renovable y combustible de reactor.

40 Los combustibles diesel tradicionales son destilados del petróleo ricos en hidrocarburos parafínicos. Ellos tienen intervalos de ebullición tan amplios como de 370° a 780°F, los cuales son adecuados para la combustión en un motor de arranque por compresión, tal como un vehículo de motor diesel. La American Society of Testing and Materials (ASTM), establece el grado de diesel de acuerdo con el intervalo de ebullición, junto con los intervalos permisibles de otras propiedades del combustibles, tales como el número de cetano, punto de nube, punto de inflamación, viscosidad, punto de anilina, contenido de azufre, contenido de agua, contenido de cenizas, corrosión de la tira de cobre, y residuos de carbono. Técnicamente, cualquier material destilado de hidrocarburos derivados de biomasa o de otro tipo que cumpla con la especificación apropiada de la ASTM, se puede definir como combustible diesel (ASTM D975), combustible de reactor (ASTM D1655), o como biodiesel o si es un éster metílico de ácido graso (ASTM D6751).

50 Después de la extracción, los lípidos y/o los componentes de los hidrocarburos recuperados a partir de la biomasa microbiana descrita en la presente, se pueden someter a tratamiento químico para fabricar un combustible para su uso en vehículos a diesel y motores a reacción.

55 El biodiesel es un líquido que varía en color – entre dorado y marrón oscuro – en dependencia de la materia prima usada en la producción. Es prácticamente inmiscible en agua, tiene un alto punto de ebullición y baja presión de vapor. El biodiesel se refiere a un combustible procesado equivalente al diesel para su uso en vehículos con motor diesel. El biodiesel es biodegradable y no tóxico. Un beneficio adicional del biodiesel con respecto a los combustibles diesel convencionales, es el menor desgaste del motor. Típicamente, el biodiesel comprende ésteres de alquilo de C14-C18. Varios procesos convierten la biomasa o un lípido producido y aislado según lo descrito en la presente, en los combustibles diesel. Un método preferido para producir biodiesel es la transesterificación de un lípido como se describe en la presente. Un éster de alquilo preferido para su uso como biodiesel es un éster metílico o éster etílico.

60 El biodiesel producido por un método descrito en la presente se puede usar solo o mezclado con combustible diesel convencional en cualquier concentración en la mayoría de los vehículos modernos de motores a diesel. Cuando se mezcla con el combustible diesel convencional (diesel de petróleo), el biodiesel puede estar presente de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 99.9%. Gran parte del mundo usa un sistema conocido como el factor "B" para establecer la cantidad de biodiesel en cualquier mezcla de combustible. Por ejemplo, el

combustible que contiene 20% de biodiesel se etiqueta B20. El biodiesel puro se refiere como B100.

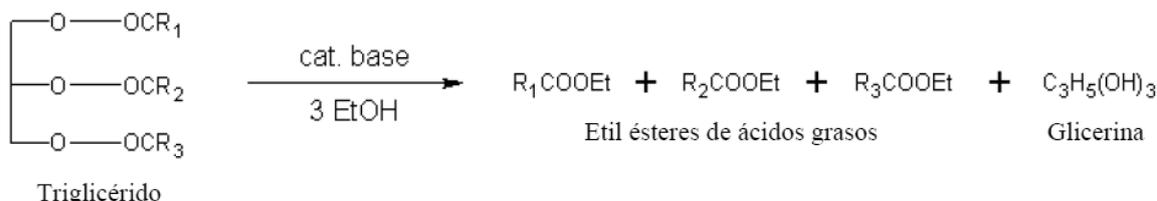
El biodiesel también puede usarse como combustible de calefacción en calderas domésticas y comerciales. Las calderas de aceite que existen pueden contener partes de caucho, y pueden requerir conversión para funcionar con biodiesel. El proceso de conversión es relativamente sencillo, el cual involucra el intercambio de las partes de caucho por partes sintéticas debido a que el biodiesel es un fuerte solvente. Debido a su fuerte poder solvente, el quemado del biodiesel incrementará la eficiencia de las calderas. El biodiesel puede usarse como un aditivo en las formulaciones de diesel para incrementar la lubricidad del combustible Ultra-Low Sulfur Diesel (ULSD) puro, lo cual es ventajoso, ya que éste prácticamente no tiene contenido de azufre. El biodiesel es un mejor solvente que el petrodiesel y se puede usar para separar los depósitos de los residuos en las líneas de combustible de los vehículos que previamente han funcionado con el petrodiesel.

El biodiesel puede producirse por transesterificación de los triglicéridos contenidos en la biomasa rica en aceites. Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para producir biodiesel. En una realización preferida, el método para producir biodiesel comprende las etapas de (a) cultivar un microorganismo que contiene lípidos usando los métodos descritos en la presente, (b) lisar un microorganismo que contiene lípidos para producir un lisado, (c) aislar los lípidos a partir del microorganismo lisado y (d) transesterificar la composición lipídica, mediante lo cual se produce el biodiesel. Los métodos para el crecimiento de un microorganismo, lisar un microorganismo para producir un lisado, tratar el lisado en un medio que comprende un solvente orgánico para formar una mezcla heterogénea y separar el lisado tratado en una composición lipídica, se han descrito anteriormente y también se pueden usar en el método de producción de biodiesel.

El perfil lipídico del biodiesel usualmente es muy similar al perfil de lípidos del aceite como materia prima. Otros aceites proporcionados por los métodos y composiciones de las invención pueden someterse a transesterificación para producir biodiesel con perfiles de lípido que incluyen (a) al menos 1%-5%, preferentemente al menos 4%, C8-C14; (b) al menos 0.25%-1%, preferentemente al menos 0.3%, C8; (c) al menos 1%-5%, preferentemente al menos 2%, C10; (d) al menos 1%-5%, preferentemente al menos 2%, C12; y (3) al menos 20%-40%, preferentemente al menos 30%, C8-C14.

Las composiciones de lípidos se pueden someter a transesterificación para producir ésteres de ácidos grasos de cadena larga, útiles como biodiesel. Las reacciones de transesterificación preferidas se describen más abajo e incluyen transesterificación catalizada por bases y transesterificación usando lipasas recombinantes. En un proceso de transesterificación catalizada por bases, los triglicéridos se hacen reaccionar con un alcohol, tal como metanol o etanol, en presencia de un catalizador alcalino, típicamente hidróxido de potasio. Esta reacción forma ésteres metílicos o etílicos y glicerina (glicerol) como un subproducto.

Los aceites animales y vegetales se hacen típicamente de triglicéridos que son ésteres de ácidos grasos libres con el alcohol trihídrico, glicerol. En la transesterificación, el glicerol en un triacilglicérido (TAG) se sustituye por un alcohol de cadena corta tal como el metanol o el etanol. Un esquema de la reacción típica es el siguiente:



En esta reacción, el alcohol se desprotona con una base para hacerlo un nucleófilo más fuerte. Comúnmente, el etanol o metanol se usan en gran exceso (hasta 50 veces). Normalmente, esta reacción se llevará a cabo de forma excesivamente lenta o no ocurrirá en lo absoluto. El calor, así como un ácido o una base, se pueden usar para ayudar a la reacción a que se lleve a cabo más rápidamente. El ácido o la base no se consumen por la reacción de transesterificación, por lo que no son reactivos sino catalizadores. Casi todo el biodiesel se ha producido usando la técnica de catalización con base, ya que ésta sólo requiere bajas temperaturas y presiones y produce por encima del 98% de rendimiento de conversión (siempre y cuando el aceite de partida sea bajo en humedad y libre de ácidos grasos).

La transesterificación también se lleva a cabo, como se mencionó anteriormente, usando una enzima, tal como una lipasa en lugar de una base. La transesterificación catalizada por lipasa puede realizarse, por ejemplo, a una temperatura entre la temperatura ambiente y 80°C, y una relación molar de TAG al alcohol inferior mayor que 1:1, preferentemente aproximadamente 3:1. Las lipasas adecuadas para usar en la transesterificación incluyen, pero sin limitarse a, las enumeradas en la Tabla 9. Otros ejemplos de lipasas útiles para la transesterificación se encuentran en, por ejemplo las patentes de Estados Unidos núms. 4,798,793; 4,940,845 5,156,963; 5,342,768; 5,776,741 y WO89/01032. Tales lipasas incluyen, pero sin limitarse a, lipasas producidas por microorganismos de Rhizopus, Aspergillus, Candida, Mucor, Pseudomonas, Rhizomucor, Candida, y Humicola y lipas del páncreas.

Tabla 9. Lipasas adecuadas para usar en la transesterificación.

Lipasa de *Aspergillus niger* ABG73614, lipasa B de *Candida antarctica* (novozym-435) CAA83122, lipasa de *Candida cylindracea* AAR24090, lipasa de *Candida lipolytica* (Lipasa L; Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), lipasa de *Candida rugosa* (por ejemplo, lipasa-OF; Meito Sangyo Co., Ltd.), lipasa de *Mucor miehei* (Lipozyme IM 20), lipasa de *Pseudomonas fluorescens* AAA25882, lipasa de *Rhizopus japonicus* (Lilipasa A-10FG) Q7M4U7\_1, lipasa de *Rhizomucor miehei* B34959, lipasa de *Rhizopus oryzae* (Lipasa F) AAF32408, lipasa de *Serratia marcescens* (SM Enzyme) ABI13521, lipasa de *Thermomyces lanuginosa* CAB58509, Lipasa P (Nagase ChemteX Corporation), y Lipasa QLM (Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya, Japón)

Un reto para usar una lipasa para la producción de ésteres de ácidos grasos adecuados para el biodiesel es que el precio de la lipasa es mucho mayor que el precio del hidróxido de sodio (NaOH) usado por los procesos de base fuerte. Este reto se abordó usando una lipasa inmovilizada, que se puede reciclar. Sin embargo, la actividad de la lipasa inmovilizada debe mantenerse después de reciclarse por un número mínimo de ciclos para permitir un proceso basado en lipasa que compita con el proceso de base fuerte en términos de costo de producción. La patente de los Estados Unidos núm. 6,398,707 (concedida el 04 de junio 2002 a Wu y otros.) describe los métodos para incrementar la actividad de las lipasas inmovilizadas y la regeneración de las lipasas inmovilizadas con actividad reducida. Algunos métodos adecuados incluyen sumergir una lipasa inmovilizada en un alcohol que tiene un número de átomos de carbono no menor que 3 durante un período de tiempo, preferentemente de 0.5-48 horas, y con la máxima preferencia de 0.5-1.5 horas. Algunos métodos adecuados también incluyen el lavado de una lipasa inmovilizada desactivada con un alcohol que tiene un número de átomos de carbono no menor que 3, y luego sumergir la lipasa inmovilizada desactivada en un aceite vegetal durante 0,5-48 horas.

En realizaciones particulares, una lipasa recombinante se expresa en los mismos microorganismos que producen los lípidos sobre los cuales actúa la lipasa. Las lipasas recombinante adecuadas incluyen las que se listan más arriba en la Tabla 9 y/o que tienen los números de acceso en el GenBank que se enumeran en la Tabla 9 anterior, o un polipéptido que tiene al menos el 70% de identidad de aminoácidos con una de las lipasas enumeradas anteriormente en la Tabla 9 y que exhibe actividad de lipasa. En las realizaciones adicionales, la actividad enzimática está presente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 99% de identidad con una de las secuencias que se describieron anteriormente, todas las cuales se incorporan por referencia en la presente como está completamente dispuesto. El ADN que codifica para la lipasa y el marcador seleccionable es preferentemente ADNc de codón optimizado. Los métodos de recodificar los genes para la expresión en microalgas se describen en la patente de los Estados Unidos núm. 7,135,290.

El estándar común internacional para biodiesel es EN 14214. ASTM D6751 es el estándar de biodiesel más común referido en los Estados Unidos y Canadá. Alemania usa la norma DIN EN 14214 y el Reino Unido exige el cumplimiento de la norma BS EN 14214. Las pruebas industriales básicas para determinar si los productos se ajustan a estas normas típicamente incluyen cromatografía de gases, HPLC, y otras. El biodiesel que cumple las normas de calidad no es muy tóxico, con un índice de toxicidad (DL<sub>50</sub>) mayor de 50 ml/kg.

Aunque el biodiesel que cumpla con las normas ASTM tiene que ser no tóxico, puede haber contaminantes que tiendan a cristalizar y/o precipitar y se desprendan de la solución como sedimentos. El sedimento o los precipitados pueden causar problemas tales como la disminución del flujo del combustible, la obstrucción de las tuberías de combustible, la obstrucción de filtros, etc. Existen procesos bien conocidos en la técnica que tratan específicamente de la eliminación de estos contaminantes y sedimentos en el biodiesel, con el objetivo de producir un producto de mayor calidad. El sedimento o los precipitados pueden causar problemas tales como la disminución del flujo del combustible, la obstrucción de las tuberías de combustible, la obstrucción de filtros, etc. Existen procesos bien conocidos en la técnica que tratan específicamente de la eliminación de estos contaminantes y sedimentos en el biodiesel, con el objetivo de producir un producto de mayor calidad. Los ejemplos de estos procesos incluyen, pero sin limitarse al tratamiento previo del aceite para eliminar contaminantes tales como fosfolípidos y ácidos grasos libres (*por ejemplo*, desgomado, refinado cáustico y filtración con adsorbente de sílice) y filtración en frío. Este proceso enfría al biodiesel y filtra cualquiera de los sedimentos o precipitados que puedan formarse cuando el combustible se usa en una temperatura más baja. Este proceso enfría al biodiesel y filtra cualquiera de los sedimentos o precipitados que puedan formarse cuando el combustible se usa en una temperatura más baja. Este proceso es bien conocido en la técnica y se describe en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2007-0175091. Los métodos adecuados pueden incluir el enfriamiento del biodiesel a una temperatura inferior a aproximadamente 38°C, de manera que las impurezas y los contaminantes precipiten como partículas en el líquido del biodiesel. La tierra de diatomeas u otro material de filtrado se pueden entonces añadir al biodiesel enfriado para formar una pasta, que luego puede filtrarse a través de una hoja de presión u otro tipo de filtro para eliminar las partículas. El biodiesel filtrado, a continuación se puede pasar a través de un filtro de pulido para eliminar los sedimentos restantes y la tierra de diatomeas, con el fin de producir el producto de biodiesel final.

El Ejemplo 13 describe la producción de biodiesel usando aceite triglicérido de *Prototheca moriformis*. La filtrabilidad por inmersión en frío por el método ASTM D6751 A1 del biodiesel producido en el Ejemplo 13 fue de 120 segundos para un volumen de 300ml. Esta prueba consiste en la filtración de 300 ml de B100, refrigerados a 40°F durante 16 horas, se dejó calentar a temperatura ambiente, y se filtró al vacío con fibra de vidrio de 0.7 micras con soporte de acero inoxidable. Los aceites de la invención se pueden transesterificar para generar biodiesel con un tiempo de inmersión en frío de menos de 120 segundos, menos de 100 y menos de 90 segundos.

Procesos posteriores también se pueden usar si el biodiesel se usa particularmente a temperaturas frías. Estos procesos incluyen el acondicionamiento para el invierno y el fraccionamiento. Existen varios enfoques para inviernizar el biodiesel. Existen varios enfoques para inviernizar el biodiesel. Un método consiste en mezclar el biodiesel con diesel de petróleo. Otro enfoque consiste en eliminar los ésteres de metilo saturados indiscriminadamente, mediante la mezcla en aditivos, permitiendo la cristalización de las grasas saturadas y luego filtrando los cristales. Otro enfoque consiste en eliminar los ésteres de metilo saturados indiscriminadamente, mediante la mezcla en aditivos, permitiendo la cristalización de las grasas saturadas y luego filtrando los cristales. El fraccionamiento separa selectivamente los ésteres de metilo en componentes o fracciones individuales, lo que permite la eliminación o inclusión de los ésteres de metilo específicos.

Otro valioso combustible proporcionado por los métodos de la presente invención es el diesel renovable, el cual comprende alcanos, tales como C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 y C18: 0, y por lo tanto se distingue del biodiesel. El diesel renovable de alta calidad se obtiene conforme a la norma ASTM D975. Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima para producir el diesel renovable. Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima para producir el diesel renovable. El diesel renovable puede producirse al menos por tres procesos: procesamiento hidrotérmico (hidrotratamiento); hidroprocesamiento; y licuefacción indirecta. Estos procesos producen destilados sin éster. Durante estos procesos, los triacilglicéridos producidos y aislados como se describe en la presente, se convierten a alcanos.

En una realización, el método para la producción del diesel renovable comprende (a) cultivar un microorganismo que contiene lípido usando los métodos descritos en la presente, (b) lisar el microorganismo para producir un lisado, (c) aislar el lípido a partir del microorganismo lisado, y (d) desoxigenar e hidrotreatar el lípido para producir un alcano, produciéndose así el diesel renovable. Los lípidos adecuados para la fabricación del diesel renovable se pueden obtener a través de la extracción de biomasa microbiana usando un solvente orgánico tal como el hexano, o a través de otros métodos, tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos núm. 5,928,696. Algunos métodos adecuados pueden incluir prensado mecánico y centrifugación.

En algunos métodos, el lípido microbiano primero se craquea conjuntamente con el hidrotratamiento para reducir la longitud de la cadena de carbono y saturar los dobles enlaces, respectivamente. El material entonces se isomeriza, también conjuntamente con el hidrotratamiento. La fracción de nafta se puede eliminar después mediante destilación, seguido de una destilación adicional para evaporar y destilar los componentes deseados en el combustible diesel con vistas a cumplir con una norma ASTM D975, mientras que los componentes más pesados de lo deseado se dejan para cumplir con la norma D975. Los métodos de hidrotratamiento, hidrocrqueo, desoxigenación e isomerización de los aceites modificados químicamente, incluyendo los aceites de triglicéridos, son bien conocidos en la técnica. Ver por ejemplo las solicitudes de patente europeas EP1741768 (A1); EP1741767 (A1); EP1682466 (A1); EP1640437 (A1); EP1681337 (A1); EP1795576 (A1); y las patentes de Estados Unidos 7,238,277; 6,630,066; 6,596,155; 6,977,322; 7,041,866; 6,217,746; 5,885,440; 6,881,873.

En una realización del método de producción del diesel renovable, el tratamiento del lípido para producir un alcano se lleva a cabo por hidrotratamiento de la composición lipídica. En el procesamiento hidrotérmico, típicamente la biomasa se hace reaccionar en agua a una temperatura y presión elevadas para formar aceites y residuos sólidos. Las temperaturas de conversión son típicamente de 300° a 660°F, con presión suficiente para mantener el agua primariamente como un líquido, de 100 a 170 atmósferas como estándar. Los tiempos de reacción son del orden de 15 a 30 minutos. Después que la reacción se completa, los orgánicos se separan del agua. De tal modo se produce un destilado apropiado para el diesel.

En algunos métodos para preparar el diesel renovable, la primera etapa del tratamiento de un triglicérido es el hidroprocesamiento para saturar los dobles enlaces, seguido por desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno y un catalizador. En algunos métodos, la hidrogenación y desoxigenación ocurren en la misma reacción. En otros métodos la desoxigenación ocurre antes de la hidrogenación. La isomerización se realiza entonces opcionalmente, también en presencia de hidrógeno y un catalizador. Los componentes de nafta se eliminan preferentemente por medio de destilación. Como ejemplos, ver las patentes de los Estados Unidos 5,475,160 (hidrogenación de los triglicéridos), 5,091,116 (desoxigenación, hidrogenación y extracción de gas), 6,391,815 (hidrogenación), y 5,888,947 (isomerización).

Un método apropiado para la hidrogenación de los triglicéridos incluye preparar una solución acuosa de sales de cobre, zinc, magnesio y lantano y otra solución de metales alcalinos o preferentemente, carbonato de

amonio. Las dos soluciones se pueden calentar a una temperatura de aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 85°C y se miden en conjunto en un recipiente de precipitación en relaciones tales que el pH en el recipiente de precipitación se mantenga entre 5,5 y 7,5 con el objetivo de formar un catalizador. Agua adicional se puede usar inicialmente en el recipiente de precipitación o añadirse al mismo tiempo que la solución de sal y la solución de precipitación. El precipitado resultante puede entonces lavarse completamente, secarse, calcinarse a 300°C y activarse en hidrógeno a temperaturas que se encuentran en el intervalo entre 100°C a 400°C. Uno o más triglicéridos pueden entonces ponerse en contacto y hacerse reaccionar con hidrógeno en presencia del catalizador descrito anteriormente en un reactor. El reactor puede ser un reactor de lecho de goteo, un reactor gas-sólido de lecho fijo, un reactor de columna de burbujas empacado, un reactor de tanque de agitación continua, un reactor de fase de suspensión, o cualquier otro tipo de reactor adecuado conocido en la técnica. El proceso se puede llevar a cabo por lotes o en forma continua. Las temperaturas de reacción están típicamente en el intervalo de aproximadamente 170°C hasta aproximadamente 250°C, mientras que las presiones de reacción están típicamente en el intervalo de aproximadamente 300 psig hasta aproximadamente 2000 psig. Además, la relación molar de hidrógeno a triglicéridos en el proceso de la presente invención esta típicamente en el intervalo de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 700:1. El proceso se lleva a cabo típicamente a una velocidad espacial horaria en peso (WHSV) en el intervalo de aproximadamente 0.1 h<sup>-1</sup> a aproximadamente 5 h<sup>-1</sup>. Un experto en la técnica reconocerá que el período de tiempo requerido para la reacción variará en función de la temperatura usada, la relación molar del hidrógeno con respecto a los triglicéridos y la presión parcial de hidrógeno. Los productos producidos por tales procesos de hidrogenación, incluyen alcoholes grasos, glicerol, rastros de parafinas y triglicéridos sin reaccionar. Estos productos se separan normalmente por medios convencionales tales como, por ejemplo, destilación, extracción, filtración, cristalización, y similares.

Las refinerías de petróleo usan el hidroprocesamiento para eliminar las impurezas mediante el tratamiento de las fuentes con hidrógeno. Las temperaturas de conversión del hidroprocesamiento son típicamente de 300° a 700° F. Las presiones son normalmente de 40 a 100 atmósferas. Los tiempos de reacción están típicamente en el orden de 10 a 60 minutos. Los catalizadores sólidos se emplean para aumentar ciertas velocidades de reacción, mejorar la selectividad de determinados productos, y optimizar el consumo de hidrógeno.

Los métodos adecuados para la desoxigenación de un aceite incluyen calentar un aceite a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 350°F hasta aproximadamente 550°F y mantener el aceite caliente continuamente en contacto con el nitrógeno, bajo al menos una presión que se encuentra en el intervalo desde aproximadamente la presión atmosférica hasta las anteriores, durante al menos aproximadamente 5 minutos.

Los métodos adecuados para la isomerización incluyen el uso de isomerización alcalina y otra isomerización de aceites conocida en la materia.

El hidrotratamiento y el hidroprocesamiento en última instancia conducen a una reducción en el peso molecular de la fuente de los triglicéridos. La molécula de triglicéridos se reduce a cuatro moléculas de hidrocarburos bajo las condiciones de hidroprocesamiento: una molécula de propano y tres moléculas de hidrocarburos más pesados, típicamente en el intervalo de C8 a C18.

De esta manera, en una realización, el producto de una o más reacción(es) química(s) que se llevan a cabo sobre las composiciones lipídicas de la invención, es una mezcla de alcanos que comprende el diesel renovable de acuerdo a la norma ASTM D975. La producción de hidrocarburos por los microorganismos se revisa por Metzger y otros, Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66: 486–496 y A Look Back en el U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann y Paul Roessler (1998).

Las propiedades de la destilación de un combustible diesel se describen en términos de T10-T90 (temperatura a 10% y 90%, respectivamente, volumen destilado). El diesel renovable se produjo a partir de aceite triglicérido de *Prototheca moriformis* y se describe en el Ejemplo 13. La T10-T90 del material producido en el Ejemplo 13 fue 57.9°C. Los métodos de tratamiento con hidrógeno, la isomerización, y otra modificación covalente de los aceites que se describen en la presente, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (tales como la filtración en frío) que se describen en la presente, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovables con otros intervalos T10-T90, tales como, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 y 65 °C mediante el uso de los aceites triglicéridos que se producen de acuerdo con los métodos que se describen en la presente.

La T10 del material producido en el Ejemplo 13 fue 242.1°C. Los métodos de tratamiento con hidrógeno, la isomerización, y otra modificación covalente de los aceites que se describen en la presente, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (como la filtración en frío) que se describen en la presente, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovables con otros valores de T10, tales como T10 entre 180 y 295, entre 190 y 270, entre 210 y 250, entre 225 y 245, y al menos 290.

La T90 del material producido en el Ejemplo 13 fue 300°C. Los métodos de tratamiento con hidrógeno, la isomerización, y otra modificación covalente de los aceites que se describen en la presente, así como los métodos

de destilación y fraccionamiento (como la filtración en frío) que se describen en la presente, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovables con otros valores de T90, tales como T90 entre 280 y 380, entre 290 y 360, entre 300 y 350, entre 310 y 340, y al menos 290.

5 La FBP del material producido en el Ejemplo 13 fue 300°C. Los métodos de tratamiento con hidrógeno, la isomerización, y otra modificación covalente de los aceites que se describen en la presente, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (como la filtración en frío) que se describen en la presente, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovables con otros valores FBP, tales como FBP entre 290 y 400, entre 300 y 385, entre 310 y 370, entre 315 y 360, y al menos 300.

10 Otros aceites proporcionados por los métodos y composiciones de la invención pueden someterse a combinaciones de hidrotratamiento, isomerización, y otra modificación covalente que incluye aceites con perfiles de lípido que incluyen (a) al menos 1%-5%, preferentemente al menos 4%, C8-C14; (b) al menos 0.25%-1%, preferentemente al menos 0.3%, C8; (c) al menos 1%-5%, preferentemente al menos 2%, C10; (d) al menos 1%-5%, preferentemente al menos 2%, C12; y (3) al menos 20%-40%, preferentemente al menos 30% C8-C14.

15 Un diesel tradicional ultra bajo en azufre se puede producir a partir de cualquier forma de biomasa mediante un proceso de dos pasos. Primero, la biomasa se convierte en un gas sintético, una mezcla gaseosa rica en hidrógeno y monóxido de carbono. Entonces el gas sintético se convierte catalíticamente en líquidos. Típicamente, la producción de líquidos se logra usando la síntesis de Fischer-Tropsch (FT). Esta tecnología se aplica al carbón, gas natural y aceites pesados. Por lo tanto, en otra realización preferida del método para la producción de diesel renovable, el tratamiento de la composición lipídica para producir un alcano se realiza mediante la licuefacción indirecta de la composición lipídica.

20 La presente invención también proporciona métodos para producir combustible de reactor. El combustible de reactor es de color claro a pajizo. El combustible más común es un combustible a base de aceite sin plomo/parafina clasificado como Aeroplane A-1, el cual se produce para un conjunto especificaciones normalizadas a nivel internacional. El combustible de avión es una mezcla de un gran número de diferentes hidrocarburos, posiblemente tanto como mil o más. El intervalo de su tamaño (peso molecular o números de carbono) está limitado por los requerimientos para el producto, por ejemplo, el punto de congelación o el punto de humo. El combustible de avión tipo Kerosone (incluyendo el Jet A y el Jet A-1) tiene una distribución del número de carbonos entre aproximadamente 8 y 16 números de carbono. El combustible de avión de tipo nafta o wide-cut (incluyendo el Jet B) típicamente tiene una distribución del número de carbonos entre aproximadamente 5 y 15 carbonos.

25 Ambos aviones (Jet A y Jet B) pueden contener un número de aditivos. Los aditivos útiles incluyen, pero sin limitarse a, antioxidantes, agentes antiestáticos, inhibidores de la corrosión, y agentes inhibidores de la congelación del sistema de combustible (FSII). Los antioxidantes previenen el engomado y usualmente se basan en fenoles alquilados, por ejemplo, AO-30, AO-31, o AO-37. Los agentes antiestáticos disipan la electricidad estática y previenen las chispas. El Stadis 450 con ácido dinonilnaftilsulfónico (DINNSA) como ingrediente activo, es un ejemplo. Los inhibidores de la corrosión, por ejemplo, el DCI-4A, se usa para combustibles civiles y militares y el DCI-6A se usa para combustibles militares. Los agentes FSII incluyen, por ejemplo, el Di-EGME.

30 En una realización de la invención, un combustible de reactor se produce mediante la mezcla de combustibles de algas con los combustibles existentes. Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima para producir combustible para aviones. Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir combustible de reactor. En la presente se proporcionan dos métodos para producir combustible para aviones a partir de los lípidos producidos por los métodos de la presente invención: craqueo catalítico fluido (FCC), e hidrodeseoxigenación (HDO).

35 El craqueo catalítico fluido (FCC) es un método que se usa para producir olefinas, especialmente propileno a partir de fracciones pesadas del crudo. Los lípidos producidos por el método de la invención se pueden convertir en olefinas. El proceso involucra el flujo de los lípidos producidos a través de una zona de FCC y se recoge una corriente del producto compuesto de olefinas, el cual es útil como combustible de reactor. Los lípidos producidos se ponen en contacto con un catalizador de craqueo en condiciones de craqueo para proporcionar una corriente del producto que comprende olefinas e hidrocarburos, útiles como combustible de reactor.

40 En una realización, el método para la producción de combustible de reactor comprende (a) cultivar un microorganismo que contiene lípido usando los métodos descritos en la presente descripción, (b) lisar el microorganismo que contiene lípido para producir un lisado, (c) aislar el lípido del lisado, y (d) tratar la composición lipídica, con lo que se produce el combustible de reactor. En una realización del método para producir un combustible de reactor, la composición de lípidos puede fluir a través de una zona de craqueo catalítica del fluido, la cual, en una realización, puede comprender poner en contacto la composición de lípidos con un catalizador de craqueo a condiciones de craqueo para proporcionar una corriente de producto que comprende olefinas C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>.

45 En ciertas realizaciones de este método, puede ser deseable eliminar los contaminantes que pueden estar

5 presentes en la composición lipídica. Por lo tanto, antes de hacer fluir la composición lipídica a través de una zona de craqueo catalítico fluido, la composición lipídica se somete a un tratamiento previo. El tratamiento previo puede incluir poner en contacto la composición lipídica con una resina de intercambio iónico. La resina de intercambio iónico es una resina de intercambio iónico ácida, tal como Amberlyst™-15 y se puede usar como lecho en un reactor a través del cual fluye la composición lipídica, ya sea hacia arriba o hacia abajo. Otros tratamientos previos pueden incluir lavados con ácidos leves por contacto de la composición lipídica con un ácido, tal como el ácido sulfúrico, acético, nítrico o clorhídrico. El contacto se realiza con una solución diluida del ácido, por lo general a temperatura ambiente y a presión atmosférica.

10 La composición lipídica, opcionalmente sometida a un tratamiento previo, se hace fluir a una zona de FCC, donde los componentes hidrocarbúricos se craquean a olefinas. El craqueo catalítico se lleva a cabo poniendo en contacto la composición lipídica en una zona de reacción con un catalizador compuesto de un material particulado finamente dividido. La reacción es de craqueo catalítico, a diferencia del hidrocraqueo, y se lleva a cabo en ausencia de hidrógeno añadido o consumo de hidrógeno. A medida que avanza la reacción de craqueo, cantidades sustanciales de coque se depositan en el catalizador. El catalizador se regenera a altas temperaturas por la quema del coque del catalizador en una zona de regeneración. El catalizador que contiene coque, que se refiere en la presente como "catalizador coquizado", se transporta continuamente desde la zona de reacción a la zona de la regeneración para regenerarse y reemplazarse por un catalizador regenerado esencialmente libre de coque a partir de la zona de regeneración. La fluidización de las partículas del catalizador mediante varias corrientes gaseosas permite el transporte del catalizador entre la zona de reacción y la zona de regeneración. Los métodos para el craqueo de los hidrocarburos, tal como los de la composición lipídica descritos en la presente, en una corriente fluidizada del catalizador, el transporte del catalizador entre las zonas de reacción y regeneración, y la combustión de coque en el regenerador, son bien conocidos por los expertos en la materia de los procesos de FCC. Las aplicaciones del FCC ejemplares y de catalizadores útiles para craquear la composición lipídica para producir olefinas C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> se describen en las patentes de los Estados Unidos núms. 6,538,169 y 7,288,685, las cuales se incorporan en su totalidad mediante referencia.

15 Los catalizadores de FCC apropiados generalmente comprenden al menos dos componentes que pueden o no estar en la misma matriz. En algunas realizaciones, ambos componentes se pueden distribuir a través de todo el recipiente de reacción. El primer componente incluye generalmente cualquiera de los catalizadores conocidos que se utilizan en la materia de craqueo catalítico fluidizado, tal como un catalizador de tipo arcilla activo amorfo y/o un tamiz molecular cristalino de alta actividad. Los catalizadores de tamiz molecular pueden preferirse a los catalizadores amorfos, debido a su selectividad muy mejorada para los productos deseados. En algunas realizaciones preferidas, las zeolitas se pueden usar como tamiz molecular en los procesos de FCC. Preferentemente, el componente del primer catalizador comprende una zeolita de poro grande, tal como una zeolita tipo Y, un material de alúmina activa, un material aglutinante, que comprende ya sea sílice o alúmina y relleno inerte tal como caolín.

20 En una realización, el craqueo de la composición lipídica de la presente invención, se lleva a cabo en la sección del ascensor o, alternativamente, la sección del elevador, de la zona de FCC. La composición lipídica se introduce en el ascensor mediante una boquilla, lo que resulta en la evaporación rápida de la composición lipídica. Antes de ponerse en contacto con el catalizador, la composición lipídica normalmente tendrá una temperatura de aproximadamente 149°C a aproximadamente 316°C (300°F a 600°F). El catalizador se hace fluir desde un recipiente de mezclado hasta el ascensor, donde entra en contacto con la composición lipídica durante un tiempo de 2 segundos o menos.

25 El catalizador mezclado y los vapores de la composición lipídica reaccionada se descargan desde la parte superior del elevador a través de una conexión de salida, y se separan en una corriente de vapor del producto craqueado como olefinas y una colección de partículas del catalizador cubiertas con cantidades sustanciales de coque que se refiere generalmente como "catalizador coquizado." En un esfuerzo por minimizar el tiempo de contacto de la composición lipídica y el catalizador, lo cual puede promover una conversión adicional de los productos deseados a otros productos no deseados, cualquier disposición de separadores, tal como una disposición de brazo en espiral, se puede utilizar para eliminar el catalizador coquizado de la corriente del producto rápidamente. El separador, por ejemplo el separador de brazo en espiral, se sitúa en una porción superior de una cámara con una zona de extracción situada en la porción inferior de la cámara. El catalizador separado por el arreglo del brazo en espiral, gotea en la zona de extracción. La corriente de vapor del producto craqueado que comprende los hidrocarburos craqueados que incluyen olefinas ligeras y algún catalizador, salen de la cámara a través de un conducto que está en comunicación con los ciclones. Los ciclones eliminan los restos de partículas del catalizador de la corriente de vapor del producto para reducir las concentraciones de partículas a niveles muy bajos. La corriente de vapor del producto entonces sale de la parte superior del recipiente de separación. El catalizador, separado por los ciclones, se devuelve al recipiente de separación y luego a la zona de extracción. La zona de extracción elimina los hidrocarburos adsorbidos de la superficie del catalizador por el contacto en contracorriente con el vapor.

30 La baja presión parcial de los hidrocarburos opera a favor de la producción de olefinas ligeras. En consecuencia, la presión del elevador se establece a aproximadamente de 172 a 241 kPa (25 a 35 psia) con una

presión parcial de hidrocarburos de aproximadamente 35 a 172 kPa (5 a 25 psia), con una presión parcial de hidrocarburos preferida de aproximadamente 69 a 138 kPa (10 a 20 psia). Esta presión parcial, relativamente baja para los hidrocarburos, se logra mediante el uso de vapor como un diluyente en la medida en que el diluyente es del 10-55wt-% en peso de la composición lipídica, y preferentemente de aproximadamente el 15wt-% en peso de la composición lipídica. Otros diluyentes, tales como gas seco, se pueden usar para alcanzar presiones parciales de hidrocarburos equivalentes.

La temperatura de la corriente de craqueo en la salida del elevador será de aproximadamente 510°C a 621°C (950°F a 1150°F). Sin embargo, las temperaturas de salida del elevador por encima de 566°C (1050°F) producen más gas seco y más olefinas. Mientras que las temperaturas de salida del ascensor por debajo de 566°C (1050°F) producen menos etileno y propileno. Por consiguiente, se prefiere para llevar a cabo el proceso de FCC a una temperatura preferida de aproximadamente 566°C a aproximadamente 630°C, presión preferida de aproximadamente de 138 kPa a aproximadamente 240 kPa (20 a 35 psia). Otra condición para el proceso es la relación del catalizador con respecto a la composición lipídica, la cual puede variar desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 y preferentemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 15.

En una realización del método para producir un combustible de reactor, la composición lipídica se introduce en la sección del elevador de un reactor de FCC. La temperatura en la sección del elevador será muy caliente y en el intervalo de aproximadamente 700°C (1292°F) a aproximadamente 760°C (1400°F) con una relación catalizador a composición de aproximadamente 100 a aproximadamente 150. Se anticipa que la introducción de la composición de lípidos dentro de la sección de elevador producirá cantidades considerables de propileno y etileno.

En otra realización del método para producir un combustible de reactor con la composición lipídica o los lípidos producidos como se describe en la presente, la estructura de la composición lipídica o de los lípidos se rompe por un proceso conocido como hidroxigenación (HDO). La HDO significa la eliminación de oxígeno por medio de hidrógeno, es decir, el oxígeno se elimina mientras que se rompe la estructura del material. Los dobles enlaces olefínicos se hidrogenan y todos los compuestos de azufre y nitrógeno se eliminan. La eliminación de azufre se llama hidrosulfuración (HDS). El tratamiento previo y la pureza de las materias primas (composición lipídica o lípidos) contribuyen a la vida útil del catalizador.

Generalmente en la etapa HDO/HDS, el hidrógeno se mezcla con el stock de la fuente (composición lipídica o lípidos) y luego la mezcla se pasa a través de un lecho del catalizador, como un flujo de co-corriente, ya sea como una sola fase o un stock de la fuente en dos fases. Después de la etapa HDO/HDS, la fracción del producto se separa y se pasa a un reactor de isomerización separado. Un reactor de isomerización para material de partida biológico se describe en la literatura (FI 100 248) como un reactor de co-corriente.

El proceso para producir un combustible por hidrogenación de una fuente del hidrocarburo, por ejemplo, la composición lipídica o los lípidos de la presente, también se puede realizar pasando la composición lipídica o los lípidos como un flujo de co-corriente con gas de hidrógeno a través de una primera zona de hidrogenación, y posteriormente el efluente del hidrocarburo se hidrogena adicionalmente en una segunda zona de hidrogenación, pasando gas de hidrógeno a la segunda zona de hidrogenación como un flujo en contracorriente con respecto al efluente del hidrocarburo. Las aplicaciones ilustrativas de la HDO y de los catalizadores útiles para craquear la composición lipídica para producir olefinas C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> se describen en la patente de los Estados Unidos núm. 7,232,935, la cual se incorpora en su totalidad mediante referencia.

Típicamente, en la etapa de hidroxigenación, la estructura del componente biológico, tal como la composición lipídica o los lípidos de la presente se descompone, el oxígeno, el nitrógeno, los compuestos de fósforo y de azufre y los hidrocarburos ligeros como gas se eliminan, y los enlaces olefínicos se hidrogenan. En la segunda etapa del proceso, es decir, en la etapa llamada de isomerización, se lleva a cabo la isomerización para la ramificación de la cadena del hidrocarburo y se mejora el rendimiento de la parafina a bajas temperaturas.

En la primera etapa, es decir, en la etapa de HDO del proceso de craqueo, el gas de hidrógeno y la composición lipídica o los lípidos de la presente que deben hidrogenarse, se pasan a un sistema de lecho del catalizador de HDO, ya sea como flujos de co-corriente o contracorriente, dicho sistema de lecho del catalizador que comprende uno o más lechos de catalizador(es), preferentemente de 1-3 lechos de catalizador. La etapa de HDO típicamente funciona de una manera en co-corriente. En el caso de un sistema de lecho del catalizador de HDO, el cual comprende dos o más lechos de catalizadores, uno o más de los lechos pueden funcionar usando el principio de flujo en contracorriente. En la etapa de HDO, la presión varía entre 20 y 150 bar, preferentemente entre 50 y 100 bar, y la temperatura varía entre 200 y 500°C, preferentemente en el intervalo de 300-400°C. En la etapa de HDO, se pueden utilizar los catalizadores de hidrogenación conocidos que contienen metales del grupo VII y/o VIB del sistema periódico. Preferentemente, los catalizadores de hidrogenación son catalizadores soportados de Pd, Pt, Ni, NiMo o un catalizador CoMo, siendo el soporte alúmina y/o sílice. Típicamente se usan los catalizadores NiMo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y CoMo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Antes de la etapa de HDO, la composición lipídica o los lípidos en la presente, opcionalmente, se pueden

tratar opcionalmente mediante prehidrogenación en condiciones más suaves, evitándose así reacciones secundarias de los dobles enlaces. Dicha prehidrogenación se lleva a cabo en presencia de un catalizador de prehidrogenación a temperaturas de 50-400°C y a presiones de hidrógeno de 1-200 bar, preferentemente a una temperatura entre 150 y 250°C y a una presión de hidrógeno entre 10 y 100 bar. El catalizador puede contener metales del grupo VIII y/o VIB del sistema periódico. Preferentemente, el catalizador de prehidrogenación es un catalizador soportado de Pd, Pt, Ni, NiMo o un catalizador CoMo, el soporte es alúmina y/o sílice.

Una corriente gaseosa a partir de la etapa de HDO que contiene hidrógeno se enfría y luego los compuestos de monóxido de carbono, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, hidrocarburos ligeros gaseosos y otras impurezas, se eliminan de la misma. Después de la compresión, el hidrógeno purificado o el hidrógeno reciclado se retornan de vuelta al primer lecho del catalizador y/o entre los lechos de catalizadores para compensar la corriente del gas eliminado. El agua se elimina a partir del líquido condensado. El líquido se pasa al primer lecho del catalizador o entre los lechos de los catalizadores.

Después de la etapa de HDO, el producto se somete a una etapa de isomerización. Es importante para el proceso que las impurezas se eliminen tan completamente como sea posible antes de que los hidrocarburos se pongan en contacto con el catalizador de isomerización. La etapa de isomerización comprende una etapa opcional de separación, en la cual el producto de reacción de la etapa de HDO se puede purificar por separación con vapor de agua o un gas adecuado, tal como hidrocarburos ligeros, nitrógeno o hidrógeno. La etapa opcional de separación se lleva a cabo en forma de contracorriente en una unidad ubicada corriente arriba del catalizador de isomerización, en la cual el gas y el líquido están en contacto uno con el otro, o antes del reactor de isomerización existente en una unidad de separación independiente que utiliza el principio de contracorriente.

Después de la etapa de separación, el gas de hidrógeno y la composición lipídica o los lípidos hidrogenados de la presente, y, opcionalmente, una mezcla de n-parafina, se pasan a una unidad de isomerización reactiva que comprende uno o varios lechos de los catalizador(es). Los lechos de los catalizadores de la etapa de isomerización podrán operar en forma de co-corriente o contracorriente.

Es importante para el proceso que el principio del flujo en contracorriente se aplique en la etapa de isomerización. En la etapa de isomerización, esto se hace llevando a cabo cualquier etapa de separación opcional o la etapa de la reacción de isomerización o ambas en forma de contracorriente. En la etapa isomerización, la presión varía en el intervalo de 20-150 bar, preferentemente en el intervalo de 20-100 bar, la temperatura está entre 200 y 500°C, preferentemente entre 300 y 400°C. En la etapa de isomerización, los catalizadores de isomerización conocidos en la materia se pueden usar. Los catalizadores de isomerización adecuados contienen el tamiz molecular y/o un metal del grupo VII y/o un vehículo. Preferentemente, el catalizador de isomerización contiene SAPO-11 o SAPO41 o ZSM-22 o ZSM-23 o ferrierita y Pt, Pd o Ni y Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y SiO<sub>2</sub>. Los catalizadores de isomerización típicos son, por ejemplo, Pt/SAPO-11/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pt/ZSM-22/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pt/ZSM-23/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y Pt/SAPO-11/SiO<sub>2</sub>. La etapa de isomerización y la etapa HDO se pueden llevar a cabo en el mismo recipiente de presión o en recipientes de presión separados. La prehidrogenación opcional se puede llevar a cabo en un recipiente de presión separado o en el mismo recipiente de presión que las etapas de HDO y de isomerización.

Así, en una realización, el producto de uno o más reacciones químicas es una mezcla de alcanos que comprende HRJ-5. En otra realización, el producto de una o más reacciones químicas es una mezcla de alcanos que comprende combustible de reactor según ASTM D1655. En algunas realizaciones, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de aviones ASTM 1655 tiene un contenido de azufre que es inferior a 10 ppm. En otras realizaciones, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de aviones ASTM 1655 tiene un valor T10 de la curva de destilación de menos de 205°C. En otra realización, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de aviones ASTM 1655 tiene un punto de ebullición final (FBP) menor que 300°C. En otra realización, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de aviones ASTM 1655 tiene un punto de inflamación de al menos 38°C. En otra realización, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de aviones ASTM 1655 tiene una densidad entre 775K/M<sup>3</sup> y 840K/M<sup>3</sup>. Todavía en otra realización, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de reactor ASTM 1655 tiene un punto de congelación que está por debajo de los -47° C. En otra realización, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de reactor ASTM 1655 tiene un calor de combustión neto que es al menos 42.8 MJ/K. En otra realización, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de reactor ASTM 1655 tiene un contenido de hidrógeno que es al menos 13.4 % la masa. En otra realización, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de reactor ASTM 1655 tiene una estabilidad térmica, según se evaluó por JFTOT gravimétrico cuantitativo a 260° C, que está por debajo de 3mm de Hg. En otra realización, la composición que se ajusta a las especificaciones del combustible de aviones ASTM 1655 tiene una goma existente que está por debajo de 7 mg/dl.

Por lo tanto, la presente invención describe una variedad de métodos en los cuales se lleva a cabo la modificación química de los lípidos de las microalgas para rendir productos útiles en una variedad de aplicaciones industriales y de otro tipo. Ejemplos de los procesos para la modificación de los aceites producidos por los métodos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, la hidrólisis del aceite, hidroprocesamiento del aceite, y

esterificación del aceite. Otra modificación química del lípido de microalgas incluye, sin limitarse a, epoxidación, oxidación, hidrólisis, sulfatación, sulfonación, etoxilación, propoxilación, amidación, y saponificación. La modificación del aceite de las microalgas produce productos oleoquímicos básicos que pueden modificarse adicionalmente en productos oleoquímicos derivados seleccionados para una función deseada. De una manera similar a la descrita anteriormente en relación con el proceso de producción del combustible, estas modificaciones químicas también se pueden realizar en los aceites generados por los cultivos microbianos descritos en la presente. Los ejemplos de oleoquímicos básicos incluyen, pero sin limitarse a, jabones, ácidos grasos, ésteres grasos, alcoholes grasos, compuestos de nitrógeno graso, metil ésteres de ácido graso, y glicerina. Los ejemplos de oleoquímicos derivados incluyen, pero sin limitarse a, nitrilos grasos, ésteres, dímeros de ácidos, quats, surfactantes, alcanolamidas grasas, sulfatos de alcohol graso, resinas, emulsificadores, alcoholes grasos, olefinas, lodos de perforación, polioles, poliuretanos, poliacrilatos, caucho, velas, cosméticos, jabones metálico, jabones, metil ésteres alfa-sulfonados, sulfatos de alcohol graso, etoxilados de alcohol graso, éter sulfatos de alcohol graso, imidazolinas, surfactantes, detergentes, ésteres, quats, productos de ozonólisis, aminas grasas, alcanolamidas grasas, etoxisulfatos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos (que incluyen triglicéridos de cadena media), lubricantes, fluidos hidráulicos, grasas, fluidos dieléctricos, agentes de liberación de moho, fluidos de trabajo de metales, fluidos de transferencia de calor, otros fluidos funcionales, productos químicos industriales (por ejemplo, limpiadores, auxiliare del procesamiento textil, plastificadores, estabilizadores, aditivos), recubrimientos de superficie, pinturas y lacas, aislamiento del cableado eléctrico, y alcanos superiores.

La hidrólisis de los constituyentes de los ácidos grasos provenientes de los glicerolípidos producidos por los métodos de la invención, produce ácidos grasos libres que pueden derivatizarse para producir otras sustancias químicas útiles. La hidrólisis se produce en presencia de agua y un catalizador que puede ser un ácido o una base. Los ácidos grasos liberados pueden derivatizarse para producir una variedad de productos, como se informa en los siguientes: patentes de Estados Unidos núms. 5,304,664 (Ácidos grasos altamente sulfatados); 7,262,158 (Composiciones de limpieza); 7,115,173 (Composiciones suavizantes de tejido); 6,342,208 (Emulsiones para el tratamiento de la piel); 7,264,886 (Composiciones que repelen el agua); 6,924,333 (Aditivos de pinturas); 6,596,768 (Materia prima de alimentación de rumiantes enriquecida en lípidos); y 6,380,410 (Surfactantes para detergentes y limpiadores).

Con respecto a la hidrólisis, en una realización de la invención, un aceite de triglicéridos primero se hidroliza opcionalmente en un medio líquido tal como agua o hidróxido de sodio, con el objetivo de obtener glicerina y jabones. Existen varios métodos de hidrólisis de los triglicéridos adecuados, que incluyen pero no limitan a, saponificación, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, hidrólisis enzimática (denominado aquí como fraccionamiento), e hidrólisis usando agua comprimida con calor. Un experto en la materia reconocerá que un aceite de triglicéridos no necesita hidrolizarse con el objetivo de producir un producto oleoquímico; más bien el aceite puede convertirse directamente al producto oleoquímico deseado mediante otro proceso conocido. Por ejemplo, el aceite de triglicéridos puede convertirse directamente en un éster metílico de ácidos grasos por medio de esterificación.

En algunas realizaciones, la hidrólisis catalítica del aceite producido por los métodos descritos en la presente, mediante el fraccionamiento del aceite en glicerina y ácidos grasos. Como se mencionó anteriormente, los ácidos grasos pueden entonces procesarse a través de varias otras modificaciones para obtener derivados oleoquímicos. Por ejemplo, en una realización, los ácidos grasos pueden sufrir una reacción de aminación para producir compuestos de nitrógeno graso. En otra realización, los ácidos grasos pueden sufrir ozonólisis para producir ácidos mono y dibásicos.

En otras realizaciones la hidrólisis puede ocurrir a través de la separación de aceites producidos en la presente descripción para crear oleoquímicos. En algunas realizaciones preferidas de la invención, un aceite triglicérido se puede separar antes de que se lleven a cabo otros procesos. Un experto en la materia reconocerá que hay muchos métodos adecuados para el fraccionamiento de los triglicéridos, que incluyen pero no limitan al fraccionamiento enzimático y el fraccionamiento por presión.

Generalmente, los métodos de fraccionamiento enzimático del aceite usan enzimas, las lipasas, las cuales actúan como biocatalizadores en una mezcla de agua y aceite. El fraccionamiento enzimático entonces fracciona el aceite o la grasa, respectivamente, en glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol puede entonces migrar a la fase del agua, mientras que la fase orgánica se enriquece con los ácidos grasos libres.

Las reacciones de fraccionamiento enzimático generalmente tienen lugar en la delimitación entre de la fase orgánica y la fase acuosa, donde la enzima está presente solamente en la delimitación de las fases. Los triglicéridos que se reúnen en la delimitación de las fases entonces contribuyen a o participan en la reacción de fraccionamiento. A medida que avanza la reacción, la densidad de ocupación o concentración de los ácidos grasos, todavía unidos químicamente como glicéridos, en comparación con los ácidos grasos libres, disminuye en la delimitación de las fases, de manera que la reacción es más lenta. En ciertas realizaciones, el fraccionamiento enzimático puede ocurrir a temperatura ambiente. Un experto en la materia conocerá las condiciones adecuadas para el fraccionamiento del aceite en los ácidos grasos deseados.

A modo de ejemplo, la velocidad de reacción puede acelerarse mediante el aumento de la superficie de delimitación de la interfaz. Una vez que la reacción se completa, los ácidos grasos entonces se separan de la fase orgánica liberada de la enzima, y el residuo que aún contiene ácidos grasos unidos químicamente como glicéridos, se alimenta de nuevo o se recicla y se mezcla con el aceite o la grasa para someterse al fraccionamiento. De esta manera, los glicéridos reciclados se someten a un proceso de fraccionamiento enzimático adicional. En algunas realizaciones, los ácidos grasos libres se extraen a partir de un aceite o grasa parcialmente fraccionada de tal manera. De esa forma, si los ácidos grasos unidos químicamente (triglicéridos) se retornan o se retroalimentan en el proceso de fraccionamiento, el consumo de la enzima se puede reducir drásticamente.

El grado de fraccionamiento se determina como la relación entre el valor de la acidez medido dividido por el valor de la acidez teóricamente posible, lo cual se puede calcular para un aceite o grasa determinados. Preferentemente, el valor de la acidez se mide por medio de titulación, de acuerdo con los métodos estándares comunes. Alternativamente, la densidad de la fase acuosa del glicerol se puede tomar como una medida del grado de fraccionamiento.

En una realización, el proceso de fraccionamiento como se describe en la presente, también es adecuado para el fraccionamiento de los mono-, di- y triglicéridos que se encuentran en el llamado jabón residual a partir de los procesos de refinación alcalina de los aceites producidos. De esta manera, el jabón residual puede convertirse cuantitativamente, sin saponificación previa de los aceites neutros, en ácidos grasos. A tal efecto, los ácidos grasos que están químicamente unidos en los jabones se liberan, preferentemente antes del fraccionamiento, a través de una adición de ácido. En ciertas realizaciones, una solución tampón se usa además del agua y la enzima para el proceso de fraccionamiento.

En una realización, los aceites producidos de acuerdo con los métodos de la invención también pueden someterse a saponificación como un método de hidrólisis. Los aceites animales y vegetales se hacen típicamente de triaglicéridos (TAG), los cuales son ésteres de ácidos grasos con el alcohol trihídrico, glicerol. En una reacción de hidrólisis alcalina, el glicerol en un TAG se elimina, dejando tres aniones ácidos carboxílicos, que se pueden asociar con los cationes de metales alcalinos tales como el sodio o el potasio, para producir sales de ácidos grasos. En este esquema, los constituyentes de los ácidos carboxílicos se disocian de la fracción del glicerol y se reemplazan con grupos hidroxilo. La cantidad de base (por ejemplo, KOH) que se usa en la reacción está determinada por el grado deseado de saponificación. Si el objetivo es, por ejemplo, producir un producto de jabón que comprenda algunos de los aceites originalmente presentes en la composición de TAG, se introduce en la mezcla de reacción una cantidad de base suficiente para convertir todos los TAG en sales de ácidos grasos. Normalmente, esta reacción se lleva a cabo en una solución acuosa y ocurre lentamente, pero se puede acelerar mediante la adición de calor. La precipitación de las sales de ácidos grasos se puede facilitar mediante la adición de sales, tales como los haluros de metales alcalinos solubles en agua (por ejemplo, NaCl o KCl), a la mezcla de reacción. Preferentemente, la base es un hidróxido de metal alcalino, tal como NaOH o KOH. Alternativamente, otras bases, tales como alcanolaminas, incluyendo por ejemplo la trietanolamina y el aminometilpropanol, se pueden usar en el esquema de reacción. En algunos casos, estas alternativas pueden ser preferibles para producir un producto jabonoso claro. En una realización la composición de lípidos sujeta a saponificación es un sebo mimético (es decir, una composición de lípidos similar a la de un sebo) que se produce como se describe en la presente, o una mezcla de un sebo mimético con otro aceite triglicérido.

En algunos métodos, la primera etapa de modificación química puede ser el hidroprocesamiento para saturar los dobles enlaces, seguido por la desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno y un catalizador. En otros métodos, la hidrogenación y la desoxigenación pueden ocurrir en la misma reacción. En aún otros métodos, la desoxigenación ocurre antes de la hidrogenación. La isomerización se puede entonces llevar a cabo opcionalmente, también en presencia de hidrógeno y un catalizador. Finalmente, los gases y los componentes de nafta, se pueden eliminar si se desea. Por ejemplo, ver las patentes de los Estados Unidos núms. 55,475,160 (hidrogenación de triglicéridos); 5,091,116 (desoxigenación, hidrogenación y eliminación de gas); 6,391,815 (hidrogenación); y 5,888,947 (isomerización).

En algunas realizaciones de la invención, los aceites triglicéridos se desoxigenan parcial o totalmente. Las reacciones de desoxigenación forman productos deseados, que incluyen pero sin limitarse a, ácidos grasos, alcoholes grasos, polioles, cetonas y aldehídos. En general, sin estar limitados por ninguna teoría en particular, las reacciones de desoxigenación involucran una combinación de varias vías de reacción diferentes, que incluyen pero sin limitarse a: hidrogenolisis, hidrogenación, hidrogenación-hidrogenolisis consecutivas, hidrogenolisis-hidrogenación consecutivas, y reacciones de hidrogenación-hidrogenolisis combinadas, dando como resultado, al menos, la eliminación parcial del oxígeno de los ácidos grasos o de los ésteres de ácidos grasos para producir productos de reacción, tales como alcoholes grasos, que se pueden convertir fácilmente a los productos químicos deseados mediante el procesamiento posterior. Por ejemplo, en una realización, un alcohol graso se puede convertir a olefinas mediante la reacción de FCC o a alcanos superiores a través de una reacción de condensación.

Una de tales modificaciones químicas es la hidrogenación, la cual es la adición de hidrógeno a los dobles enlaces en los ácidos grasos constituyentes de los glicerolípidos o de los ácidos grasos libres. El proceso de

hidrogenación permite la transformación de los aceites líquidos en grasas semisólidas o sólidas, las cuales pueden ser más adecuadas para aplicaciones específicas.

5 La hidrogenación de aceites que se producen por los métodos descritos en la presente descripción se puede llevar a cabo en conjunto con uno o más de los métodos y/o materiales que se proporcionan en la presente descripción, como se informó en los siguientes: patentes de Estados Unidos núms. 7,288,278 (Aditivos de alimento o medicamentos); 5,346,724 (Productos de lubricación); 5,475,160 (Alcoholes grasos); 5,091,116 (Aceites comestibles); 6,808,737 (Grasas estructurales para margarina y pastas para untar); 5,298,637 (Sustitutos de grasas con calorías reducidas); 6,391,815 (Catalizador de hidrogenación y adsorbente de azufre); 5,233,099 y 5,233,100 (Alcoholes grasos); 4,584,139 (Catalizadores de hidrogenación); 6,057,375 (Agentes supresores de espuma); y 7,118,773 (Emulsiones de pastas para untar comestibles).

15 Un experto en la materia reconocerá que se pueden usar varios procesos para hidrogenar los hidratos de carbono. Un método conveniente incluye poner en contacto los hidratos de carbono con hidrógeno o hidrógeno mezclado con un gas adecuado y un catalizador, bajo condiciones suficientes en un reactor de hidrogenación para formar un producto hidrogenado. El catalizador de la hidrogenación generalmente puede incluir Cu, Re, Ni, Fe, Co, Ru, Pd, Rh, Pt, Os, Ir, y aleaciones o cualquier combinación de los mismos, ya sean solos o con promotores, tales como W, Mo, Au, Ag, Cr, Zn, Mn, Sn, B, P, Bi, y aleaciones o cualquier combinación de los mismos. Otros materiales catalizadores de la hidrogenación efectivos incluyen tanto el níquel soportado o el rutenio modificado con renio. En una realización, el catalizador de la hidrogenación también incluye cualquiera de los soportes, dependiendo de la funcionalidad deseada del catalizador. Los catalizadores de la hidrogenación se pueden preparar por los métodos conocidos por los expertos en la materia.

25 En algunas realizaciones, el catalizador de la hidrogenación incluye un catalizador de metal del grupo VIII apoyado y un material de esponja de metal (por ejemplo, un catalizador de esponja de níquel). El níquel Raney proporciona un ejemplo de un catalizador de esponja de níquel activado, adecuado para su uso en esta invención. En otra realización, la reacción de hidrogenación en la invención se lleva a cabo usando un catalizador que comprende un catalizador de níquel-renio o un catalizador de níquel-tungsteno modificado. Un ejemplo de un catalizador adecuado para la reacción de hidrogenación de la invención es un catalizador de níquel-renio apoyado en carbono.

35 En una realización, un catalizador de níquel Raney adecuado se puede preparar mediante el tratamiento de una aleación de cantidades aproximadamente iguales en peso de níquel y aluminio con una solución alcalina acuosa, por ejemplo, que contiene aproximadamente 25% en peso de hidróxido de sodio. El aluminio se disuelve selectivamente por la solución alcalina acuosa, dando como resultado un material en forma de esponja que comprende mayormente níquel con pequeñas cantidades de aluminio. La aleación inicial incluye metales promotores (a saber, molibdeno y cromo) en cantidades tales que aproximadamente del 1 al 2% del peso se mantiene en el catalizador en la forma de esponja de níquel. En otra realización, el catalizador de la hidrogenación se prepara usando una solución de nitrosilnitrato de rutenio (III), cloruro de rutenio (III) en agua para impregnar un material de soporte adecuado. La solución entonces se seca para formar un sólido que tiene un contenido de agua de menos de aproximadamente el 1% en peso. El sólido puede entonces reducirse a la presión atmosférica en una corriente de hidrógeno a 300°C (sin calcinarse) o 400°C (calcinado) en un horno rotatorio de bolas durante 4 horas. Después de enfriarse y dar lugar al catalizador inerte con nitrógeno, el 5% en volumen del oxígeno en el nitrógeno se pasa sobre el catalizador durante 2 horas.

45 En ciertas realizaciones, el catalizador descrito incluye un soporte de catalizador. El soporte del catalizador estabiliza y soporta el catalizador. El tipo de soporte del catalizador usado depende del catalizador escogido y de las condiciones de reacción. Los soportes adecuados para la invención incluyen, pero sin limitarse a, carbono, sílice, sílice-alúmina, zirconia, titania, ceria, vanadio, nitruro, nitruro de boro, heteropoliácidos, hidroxiapatito, óxido de zinc, cromía, zeolita, nanotubos de carbono, fullereno de carbono y cualquier combinación de estos.

55 Los catalizadores utilizados en esta invención se pueden preparar por los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los métodos adecuados pueden incluir, pero sin limitarse a, humedecimiento incipiente, impregnación evaporativa, deposición química de vapor, lavado de recubrimiento, técnicas de pulverización catódica, y similares.

60 Las condiciones para que llevar a cabo la reacción de hidrogenación pueden variar en función del tipo de materia prima y los productos deseados. Un experto en la materia, con el beneficio de esta divulgación, reconocerá las condiciones de reacción adecuadas. En general, la reacción de hidrogenación se lleva a cabo a temperaturas de 80°C a 250°C, y preferentemente de 90°C a 200°C, y más preferentemente de 100°C a 150°C. En algunas realizaciones, la reacción de hidrogenación se lleva a cabo a presiones de 500 kPa a 14 000 kPa.

65 El hidrógeno usado en la reacción de hidrogenación de la presente invención puede incluir hidrógeno externo, hidrógeno reciclado, hidrógeno generado in situ, y cualquier combinación de los mismos. Tal como se usa en la presente, el término "hidrógeno externo" se refiere al hidrógeno que no se origina de la reacción de la biomasa

en sí, sino que se añade al sistema de otra fuente.

En algunas realizaciones de la invención, es deseable convertir los carbohidratos de partida en una molécula más pequeña que será más fácil de convertirse en los hidrocarburos superiores deseados. Un método conveniente para esta conversión es a través de una reacción de hidrogenólisis. Varios procesos se conocen para realizar la hidrogenólisis de los carbohidratos. Un método apropiado incluye poner en contacto un hidrato de carbono con hidrógeno o hidrógeno mezclado con un gas adecuado y un catalizador de hidrogenólisis en un reactor de hidrogenólisis, bajo condiciones suficientes para formar un producto de reacción que comprende moléculas más pequeñas o polioles. Tal como se utiliza en la presente, el término "moléculas más pequeñas o polioles" incluye cualquier molécula que tiene un peso molecular más pequeño, que puede incluir un número menor de átomos de carbono o de átomos de oxígeno que los hidratos de carbono de partida. En una realización, los productos de reacción son moléculas más pequeñas que incluyen polioles y alcoholes. Una persona con conocimientos comunes en la materia sería capaz de seleccionar el método apropiado para llevar a cabo la reacción de hidrogenólisis.

En algunas realizaciones, un alcohol de azúcar o azúcar de 5 ó 6 carbonos se puede convertir a propilenglicol, etilenglicol y glicerol con un catalizador de la hidrogenólisis. El catalizador de la hidrogenólisis puede incluir Cr, Mo, W, Re, Mn, Cu, Cd, Fe, Co, Ni, Pt, Pd, Rh, Ru, Ir, Os, y aleaciones o cualquier combinación de los mismos, ya sean solos o con promotores de tales como Au, Ag, Cr, Zn, Mn, Sn, Bi, B, O y aleaciones o cualquier combinación de los mismos. El catalizador de la hidrogenólisis puede incluir también un catalizador de piropolímero carbonoso que contiene metales de transición (por ejemplo, cromo, molibdeno, tungsteno, renio, manganeso, cobre, cadmio) o metales del grupo VIII (por ejemplo, hierro, cobalto, níquel, platino, paladio, rodio, rutenio, iridio y osmio). En ciertas realizaciones, el catalizador de la hidrogenólisis puede incluir cualquiera de los metales anteriores, combinado con un óxido de metal alcalinotérreo o adherido a un soporte catalíticamente activo. En ciertas realizaciones, el catalizador en la reacción de hidrogenólisis puede incluir un soporte de catalizador como el descrito anteriormente para la reacción de hidrogenación.

Las condiciones para que llevar a cabo la reacción de hidrogenólisis pueden variar en función del tipo de materia prima y los productos deseados. Un experto en la materia, con beneficio de esta divulgación, reconocerá las condiciones apropiadas a usar para llevar a cabo la reacción. En general, la reacción de hidrogenólisis se lleva a cabo a temperaturas de 110°C a 300°C, y preferentemente de 170°C a 220°C, y más preferentemente de 200°C a 225°C. En algunas realizaciones, la reacción de hidrogenólisis se realiza bajo condiciones básicas, preferentemente a un pH de 8 a 13, y aún con mayor preferencia a un pH de 10 a 12. En algunas realizaciones, la reacción de condensación se lleva a cabo a presiones en un intervalo entre 60 KPa y 16500 KPa, y preferentemente en un intervalo entre 1700 KPa y 14000 KPa, y aún con mayor preferencia entre 4800 KPa y 11000 KPa.

El hidrógeno usado en la reacción de hidrogenólisis de la presente invención puede incluir hidrógeno externo, hidrógeno reciclado, hidrógeno generado in situ, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los productos de reacción mencionados anteriormente pueden convertirse en hidrocarburos superiores a través de una reacción de condensación en un reactor de condensación. En tales realizaciones, la condensación de los productos de reacción se produce en presencia de un catalizador capaz de formar hidrocarburos superiores. Aunque no se pretende limitarse por la teoría, se cree que la producción de hidrocarburos superiores ocurre a través de una reacción de adición por pasos, la cual incluye la formación de enlaces carbono-carbono o enlaces carbono-oxígeno. Los productos de reacción resultantes incluyen cualquier número de compuestos que contienen estos residuos, tal como se describe con más detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, los catalizadores de condensación adecuados incluyen un catalizador ácido, un catalizador básico, o un catalizador ácido/básico. Como se usa en la presente, el término "catalizador ácido/básico" se refiere a un catalizador que tiene una funcionalidad ácido y una base. En algunas realizaciones, el catalizador de condensación puede incluir, sin limitarse a, zeolitas, carburos, nitruros, zirconia, alúmina, sílice, aluminosilicatos, fosfatos, óxidos de titanio, óxidos de zinc, óxidos de vanadio, óxidos de lantano, óxidos de itrio, óxidos de escandio, óxidos de magnesio, óxidos de cerio, óxidos básicos, óxidos de calcio, hidróxidos, heteropoliácidos, ácidos inorgánicos, resinas ácidas modificadas, resinas básicas modificadas, y cualquier combinación de estos. En algunas realizaciones, el catalizador de condensación puede incluir, además, un modificador. Los modificadores adecuados incluyen La, Y, Sc, P, B, Bi, Li, Na, K, Rb, Cs, Mg, Ca, Sr, Ba, y cualquier combinación de estos. En algunas realizaciones, el catalizador de condensación puede incluir, además, un metal. Los metales adecuados incluyen Cu, Ag, Au, Pt, Ni, Fe, Co, Ru, Zn, Cd, Ga, In, Rh, Pd, Ir, Re, Mn, Cr, Mo, W, Sn, Os, aleaciones, y cualquier combinación de estos.

En ciertas realizaciones, el catalizador descrito en la reacción de condensación puede incluir un soporte de catalizador como el descrito anteriormente para la reacción de hidrogenación. En ciertas realizaciones, el catalizador de la condensación es autosuficiente. Tal como se usa en la presente, el término "autosuficiente" significa que el catalizador no necesita de otro material que le sirva de soporte. En otras realizaciones, el catalizador de la condensación se usa conjuntamente con un soporte separado apropiado para suspender el catalizador. En una realización, el soporte del catalizador de la condensación es sílice.

Las condiciones bajo las cuales la reacción de condensación se produce pueden variar en función del tipo de materia prima y los productos deseados. Un experto en la materia, con beneficio de esta divulgación, reconocerá las condiciones apropiadas a usar para llevar a cabo la reacción. En algunas realizaciones, la reacción de condensación se lleva a cabo a una temperatura en la cual la termodinámica de la reacción propuesta sea favorable. La temperatura para la reacción de condensación puede variar dependiendo del poliol o alcohol de partida específico. En algunas realizaciones, la temperatura de la reacción de condensación se encuentra en un intervalo desde 80°C hasta 500°C, y preferentemente desde 125°C hasta 450°C, y más preferentemente desde 125°C hasta 250°C. En algunas realizaciones, la reacción de condensación se lleva a cabo a presiones en un intervalo de 0 kPa a 9000 kPa, y preferentemente en un intervalo entre 0 kPa y 7000 kPa, y aún más preferentemente entre 0 kPa y 5000 kPa.

Los alcanos superiores formados por la invención incluyen, pero sin limitarse a, alcanos de cadena recta o ramificada que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, alquenos de cadena recta o ramificada que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, cicloalcanos que tienen de 5 a 30 átomos de carbono, cicloalquenos que tienen de 5 a 30 átomos de carbono, arilos, arilos fusionados, alcoholes, y cetonas. Los alcanos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, butano, pentano, penteno, 2-metilbutano, hexano, hexeno, 2-metilpentano, 3-metilpentano, 2,2-dimetilbutano, 2,3-dimetilbutano, heptano, hepteno, octano, octeno, 2,2,4-trimetilpentano, 2,3-dimetilhexano, 2,3,4-trimetilpentano, 2,3-dimetilpentano, nonano, noneno, decano, deceno, undecano, undeceno, dodecano, dodeceno, tridecano, trideceno, tetradecano, tetradeceno, pentadecano, pentadeceno, nonildecano, nonildeceno, eicosano, eicoseno, uneicosano, uneicoseno, doeicosano, doeicoseno, triecosano, triecoseno, tetraecosano, tetraecoseno, e isómeros de éstos. Algunos de estos productos pueden ser adecuados para usar como combustibles.

En algunas realizaciones, los cicloalcanos y los cicloalquenos son no sustituidos. En otras realizaciones, los cicloalcano y los cicloalquenos son mono-sustituidos. En aún otras realizaciones, los cicloalcano y los cicloalquenos son multi-sustituidos. En las realizaciones que comprenden los cicloalcanos y cicloalquenos sustituidos, el grupo sustituido incluye, sin limitarse a, un alquil de cadena recta o ramificada que tiene 1 a 12 átomos de carbono, un alqueno de cadena recta o ramificada que tiene 1 a 12 átomos de carbono, un fenilo, y cualquier combinación de estos. Los cicloalcanos y cicloalquenos incluyen, pero sin limitarse a, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexeno, metil-ciclopentano, metil-ciclopenteno, etil-ciclopentano, etil-ciclopenteno, etil-ciclohexano, etil-ciclohexeno, isómeros y cualquier combinación de estos.

En algunas realizaciones, los arilos formados son no sustituidos. En otra realización, los arilos formados son mono-sustituidos. En las realizaciones que comprenden los arilos sustituidos, el grupo sustituido incluye, sin limitarse a, un alquil de cadena recta o ramificada que tiene 1 a 12 átomos de carbono, un alqueno de cadena recta o ramificada que tiene 1 a 12 átomos de carbono, un fenilo, y cualquier combinación de estos. Los arilos adecuados para la invención incluyen, pero sin limitarse a, benceno, tolueno, xileno, etil benceno, para xileno, meta xileno, y cualquier combinación de estos.

Los alcoholes producidos en la invención tienen de 4 a 30 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los alcoholes son cíclicos. En otras realizaciones, los alcoholes son ramificados. En otra realización, los alcoholes son de cadena recta. Los alcoholes adecuados para la invención incluyen, pero sin limitarse a, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol, undecanol, dodecanol, tridecanol, tetradecanol, pentadecanol, hexadecanol, heptildecanol, octildecanol, nonildecanol, eicosanol, uneicosanol, doeicosanol, triecosanol, tetraecosanol, e isómeros de éstos.

Las cetonas producidas en la invención tienen de 4 a 30 átomos de carbono. En una realización, las cetonas son cíclicas. En otra realización, las cetonas son ramificadas. En otra realización, las cetonas son de cadena recta. Las cetonas adecuadas para la invención incluyen, pero sin limitarse a, butanona, pentanona, hexanona, heptanona, octanona, nonanona, decanona, undecanona, dodecanona, tridecanona, tetradecanona, pentadecanona, hexadecanona, heptildecanona, octildecanona, nonildecanona, eicosanona, uneicosanona, doeicosanona, triecosanona, tetraecosanona, e isómero de éstos.

Otra de tales modificaciones químicas es la interesterificación. Los glicerolípidos producidos naturalmente no tienen una distribución uniforme de los constituyentes de los ácidos grasos. En el contexto de los aceites, la interesterificación se refiere al intercambio de radicales acilo entre dos ésteres de diferentes glicerolípidos. El proceso de interesterificación proporciona un mecanismo mediante el cual los constituyentes de los ácidos grasos de una mezcla de glicerolípidos pueden reordenarse para modificar el patrón de distribución. La interesterificación es un proceso químico conocido, y generalmente comprende el calentamiento (a aproximadamente 200°C) de una mezcla de aceites por un período de tiempo (por ejemplo, 30 minutos) en presencia de un catalizador, tal como un metal alcalino o metal alcalino alquilado (por ejemplo, metóxido de sodio). Este proceso se puede usar para seleccionar al azar el patrón de distribución de los constituyentes de los ácidos grasos de una mezcla de aceite, o puede dirigirse para producir un patrón de distribución deseado. Este método de modificación química de los lípidos se puede llevar a cabo en los materiales proporcionados en la presente, tal como la biomasa microbiana, con un porcentaje de peso seco de las células como lípidos de al menos el 20%.

La interesterificación dirigida, en la cual se busca un patrón de distribución específica de los ácidos grasos, se puede realizar mediante el mantenimiento de la mezcla de aceites a una temperatura por debajo del punto de fusión de algunos TAG que pudieran obtenerse. Esto resulta en la cristalización selectiva de estos TAG, lo cual los elimina eficientemente de la mezcla de reacción donde cristalizan. El proceso puede continuar hasta que la mayoría de los ácidos grasos en el aceite hayan precipitado, por ejemplo. Un proceso de interesterificación dirigida puede usarse, por ejemplo, para producir un producto con un contenido calórico inferior a través de la sustitución de los ácidos grasos de cadena larga con sus homólogos de cadena más corta. La interesterificación dirigida también se puede utilizar para producir un producto con una mezcla de grasas que pueden proporcionar las características de fusión deseadas y los rasgos estructurales buscados en los aditivos o productos alimentarios (por ejemplo, la margarina) sin recurrir a la hidrogenación, la cual puede producir isómeros trans no deseados.

La interesterificación de aceites producidos por los métodos que se describen en la presente descripción se puede llevar a cabo en conjunto con uno o más de los métodos y materiales, o para producir productos, como se informó en los siguientes: patente de Estados Unidos núms. 6,080,853 (Sustitutos de grasas no digeribles); 4,288,378 (Estabilizador de mantequilla de cacahuete); 5,391,383 (Aceite atomizado comestible); 6,022,577 (Grasas comestibles para productos alimenticios); 5,434,278 (Grasas comestibles para productos alimenticios); 5,268,192 (Productos de nueces de bajas calorías); 5,258,197 (Composiciones comestibles de bajas calorías); 4,335,156 (Productos de grasa comestibles); 7,288,278 (Aditivos de alimentos o medicamentos) 7,115,760 (Proceso de fraccionamiento); 6,808,737 (Grasas estructurales); 5,888,947 (Lubricantes de motores); 5,686,131 (Mezclas de aceites comestibles); y 4,603,188 (Composiciones de uretano curables).

En una realización de conformidad con la invención, la transesterificación del aceite, según lo descrito anteriormente, se sigue por la reacción del producto transesterificado con poliol, como se divulgó en la patente de los Estados Unidos núm. 6,465,642, para producir el poliol poliéster de ácido graso. Este proceso de esterificación y separación puede comprender los siguientes pasos d: reaccionar un éster de alquilo inferior con el poliol en presencia de jabón; eliminar los restos de jabón de la mezcla de productos; lavar con agua y secar la mezcla de productos para eliminar las impurezas; blanquear la mezcla de productos para su refinación; separar al menos una porción del éster de alquilo inferior sin reaccionar del poliol poliéster de ácido graso en la mezcla de productos; y reciclar el éster de alquilo inferior sin reaccionar separado.

La transesterificación puede realizarse además en la biomasa microbiana con ésteres de ácido graso de cadena corta, como se informó en la patente de Estados Unidos 6,278,006. En general, la transesterificación se puede llevar a cabo por la adición de un éster de ácido graso de cadena corta a un aceite en presencia de un catalizador adecuado y el calentamiento de la mezcla. En algunas realizaciones, el aceite comprende de aproximadamente 5% a aproximadamente 90% de la mezcla de reacción en peso. En algunas realizaciones, los ésteres de ácidos grasos de cadena corta pueden constituir aproximadamente 10% a 50% de la mezcla de reacción en peso. Los ejemplos no limitantes de catalizadores incluyen catalizadores básicos, metóxido de sodio, catalizadores ácidos, incluyendo ácidos inorgánicos tales como ácido sulfúrico y arcillas acidificadas, ácidos orgánicos tales como ácido metano sulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido toluenosulfónico, y resinas ácidas, tales como Amberlyst 15. Los metales como sodio y magnesio, y los hidruros de metal son también catalizadores útiles.

Otra de tales modificaciones químicas es la hidroxilación, la cual involucra la adición de agua a un doble enlace lo que resulta en saturación e incorporación de un radical hidroxilo. El proceso de hidroxilación proporciona un mecanismo para la conversión de uno o más constituyentes de los ácidos grasos de un glicerolípido a un ácido graso hidroxilo. La hidroxilación se puede llevar a cabo, por ejemplo, a través del método que se informó en la patente de los Estados Unidos núm. 5,576,027. Los ácidos grasos hidroxilados, incluyendo el aceite de ricino y sus derivados, son útiles como componentes en diversas aplicaciones industriales, incluyendo los aditivos alimentarios, pigmentos, agentes humectantes, agentes antiespumantes, aditivos impermeabilizantes, agentes plastificantes, emulsificantes cosméticos y/o agentes desodorantes, así como en la electrónica, productos farmacéuticos, pinturas tintas adhesivos, y lubricantes. Un ejemplo de cómo se puede realizar la hidroxilación de un glicérido es como sigue: la grasa se puede calentar, preferentemente a aproximadamente 30-50°C combinada con heptano y se mantiene a la temperatura durante treinta minutos o más; después se puede agregar ácido acético a la mezcla seguido de una solución acuosa de ácido sulfúrico seguido por una solución acuosa de peróxido de hidrógeno la cual se añade en pequeños incrementos a la mezcla durante una hora; después del peróxido de hidrógeno acuoso, la temperatura puede incrementarse hasta al menos aproximadamente 60°C y se agita al menos durante seis horas; después de la agitación la mezcla se deja reposar y una capa acuosa inferior formada por la reacción puede eliminarse mientras que la capa superior de heptano formada por la reacción se puede lavar con agua caliente a una temperatura de aproximadamente 60°C, la capa de heptano lavada se puede neutralizar con una solución acuosa de hidróxido de potasio a un pH de aproximadamente 5 a 7 y después se elimina por destilación al vacío; el producto de reacción puede secarse al vacío a 100°C y el producto seco se desodoriza con vapor en condiciones de vacío y se filtra a aproximadamente 50° a 60°C usando tierra de diatomeas.

La hidroxilación de aceites microbianos producidos por los métodos que se describen en la presente

descripción se puede llevar a cabo en conjunto con uno o más de los métodos y/o materiales, o para producir productos, como se informa en los siguientes: patentes de Estados Unidos núms. 6,590,113 (Recubrimientos y tintas basados en aceites); 4,049,724 (Procesos de hidroxilación); 6,113,971 (Mantequilla de aceite de oliva); 4,992,189 (Lubricantes y aditivos para lubricantes); 5,576,027 (Leche hidroxilada); y 6,869,597 (cosméticos).

Los glicerolípidos hidroxilados se pueden convertir en estolides. Los estolides consisten de un glicerólido en el cual un constituyente de ácido graso hidroxilado se ha esterificado a otra molécula de ácido graso. La conversión de glicerolípidos hidroxilados a estolides se puede llevar a cabo mediante el calentamiento de una mezcla de glicerolípidos y ácidos grasos, y poniendo en contacto la mezcla con un ácido mineral, según lo descrito por Isbell y otros, *JAOCS* 71(2): 169-174 (1994). Los estólidos son útiles en una variedad de aplicaciones, que incluyen sin limitación aquellas informadas en los siguientes: patentes de Estados Unidos núms. 7,196,124 (Materiales elastoméricos y recubrimiento de pisos); 5,458,795 (Aceites espesados para aplicaciones a altas temperaturas); 5,451,332 (Fluidos para aplicaciones industriales); 5,427,704 (Aditivos para combustible); y 5,380,894 (Lubricantes, grasas, plastificadores, y tintas de impresión).

Otra de tales modificaciones químicas es la metatesis de olefina. En la metatesis de olefinas, un catalizador corta los carbonos alquilideno en un alqueno (olefina) y forma nuevos alquenos al parear cada uno de ellos con carbonos alquilideno diferentes. La reacción de metatesis de olefinas proporciona un mecanismo para procesos tales como truncar cadenas alquilo de ácidos grasos insaturados a alquenos por etenolisis, entrecruzamiento de ácidos grasos a través de enlaces de alqueno por auto-metatesis, e incorporación de nuevos grupos en los ácidos grasos por entre-metatesis con alquenos derivatizados.

En conjunto con otras reacciones, tales como transesterificación e hidrogenación, la metatesis de olefinas puede transformar glicerolípidos insaturados en diversos productos finales. Estos productos incluyen oligómeros de glicerolípidos para ceras; glicerolípidos de cadenas cortas para lubricantes; cadenas alquil homo y hetero bifuncionales para químicos y polímeros; ésteres de cadenas cortas para biocombustible; e hidrocarburos de cadenas cortas para combustible de reactor. La metatesis de olefinas se puede llevar a cabo en derivados de triacilgliceroles y ácidos grasos, por ejemplo, usando catalizadores y métodos que se informaron en la patente en Estados Unidos núm. 7,119,216, publicación de patente de Estados Unidos núm. 2010/0160506, y publicación de patente de Estados Unidos Num. 2010/0145086.

La metatesis de olefinas de bio-aceites generalmente comprende añadir una solución del catalizador Ru a una carga de aproximadamente 10 a 250 ppm bajo condiciones inertes a ésteres de ácidos grasos insaturados en presencia (inter-metatesis) o ausencia (auto-metatesis) de otros alquenos. Las reacciones típicamente se permite que procedan por horas a días y en última instancia rinden una distribución de productos alquenos. Un ejemplo de cómo la metatesis de olefinas se puede llevar a cabo en un derivado de ácido graso es como sigue: Una solución del catalizador Grubbs de primera generación (dicloro[2(1-metiletox- $\alpha$ -O)fenil]metileno- $\alpha$ -C] (tricicloheil-fosfamina) en tolueno a una carga de catalizador de 222 ppm se puede añadir a un recipiente que contiene oleato de metilo desgasificado y seco. Después el recipiente se puede presurizar con aproximadamente 60 psig de gas etileno y mantenerse a o por debajo de aproximadamente 30°C por 3 horas, de forma que se puede producir aproximadamente un 50% de rendimiento de metilo 9-decanoato.

La metatesis olefinica de los aceites productos por los métodos descritos en la presente se puede realizar conjuntamente con uno o más de los métodos y/o materiales, o para producir productos, como se informaron en los siguientes documentos: sol. de patente PCT/US07/081427 (ácido grasos de  $\alpha$ -olefina) y sol. de patentes de Estados Unidos núms. 12/281,938 (cremas de petróleo), 12/281,931 (cápsulas de pistola de bolas de pintura), 12/653,742 (plastificadores y lubricantes), 12/422,096 (compuestos orgánicos bifuncionales), y 11/795,052 (cera de vela).

Otras reacciones químicas que se pueden realizar sobre los aceites microbianos incluyen hacer reaccionar los triglicéridos con un agente ciclopropanante para incrementar la fluidez y/o estabilidad oxidativa, según se divulga en las patentes de los Estados Unidos 6,051,539 (fabricación de ceras a partir de triacilgliceroles), 6,770,104 (epoxidación de triacilgliceroles), según se divulga en "The effect of fatty acid composition on the acrylation kinetics of epoxidized triacylglycerols", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79:1, 59-63, (2001) y en *Free Radical Biology and Medicine*, 37:1, 104-114 (2004).

La generación de biomasa microbiana oleaginosas para combustibles y productos químicos como se describe anteriormente, resulta en la producción de harina de biomasa deslipidada. La harina deslipidada es un subproducto de la preparación de aceite de algas y es útil para la alimentación animal para animales de granja, por ejemplo, rumiantes, aves de corral, cerdos y para la acuicultura. La harina resultante, aunque el contenido de aceites es reducido, todavía contiene proteínas de alta calidad, carbohidratos, fibra, cenizas, restos de aceite y otros nutrientes adecuados para una alimentación animal. Debido a que las células están predominantemente lisadas por el proceso de separación de los aceites, la harina de deslipidada es fácilmente digerible por estos animales. La harina deslipidada opcionalmente se puede combinar con otros ingredientes, tales como granos, en un alimento animal. Debido a que la harina deslipidada tiene una consistencia de polvo, se puede comprimir en gránulos usando un extrusor o extensor u otro tipo de máquina, las cuales se encunetran comercialmente disponibles.

La invención, que es descrita en detalle anteriormente, se ejemplifica en los siguientes ejemplos, que se ofrecen para ilustrar pero no para limitar, la invención reivindicada.

## 5 VII. EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Métodos para el cultivo de *Prototheca*

10 Las cepas de *Prototheca* se cultivaron para lograr un alto porcentaje de aceite por peso seco de células. Las células criopreservadas se descongelaron a temperatura ambiente y 500 µl de células se añadieron a 4.5 ml de medio (4.2 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.1 g/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.24 g/l de MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 0.25 g/l de ácido cítrico monohidrato, 0.025 g/l de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 2 g/l de extracto de levadura) más 2% de glucosa y crecieron durante 7 días a 28°C con agitación (200 rpm) en una placa de 6 pocillos. El peso seco de las células se determinó por centrifugación de 1 ml de cultivo a 14000 rpm durante 5 min en un tubo Eppendorf pre-pesado. El sobrenadante de cultivo se desechó y el sedimento celular resultante se lavó con 1 ml de agua desionizada. El cultivo se centrifugó de nuevo, se desechó el sobrenadante, y el sedimento de células se colocó a -80°C hasta que se congeló. Las muestras se liofilizaron después por 24 horas y se calculó el peso seco de las células. Para la determinación de lípidos totales en los cultivos, se retiraron 3 ml de cultivo y se sometieron a análisis mediante el uso de un sistema de Ankom (Ankom Inc., Macedon, NY), según el protocolo del fabricante. Las muestras se sometieron a extracción por solventes con un extractor Amkom XT10 según el protocolo del fabricante. Los lípidos totales se determinaron como la diferencia de masa entre las muestras secas hidrolizadas con ácido y las muestras secas extraídas con disolvente. Las mediciones del porcentaje de aceite del peso seco de las células se muestran en la Tabla 10.

25 Tabla 10. Porcentaje de aceite por peso seco de la célula

Especie	Cepa	% Aceite
<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 327	13.14
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441	18.02
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1435	27.17

30 Se genotiparon muestras de microalgas de múltiples cepas del género *Prototheca*. El ADN genómico se aisló a partir de la biomasa de algas de la siguiente manera. Las células de cultivos líquidos (aproximadamente 200 mg) se centrifugaron 5 minutos a 14,000 x g. Las células se resuspendieron después en agua destilada estéril, se centrifugaron 5 minutos a 14,000 xg y se desechó el sobrenadante. Una sola perla de vidrio de ~ 2 mm de diámetro se añadió a la biomasa y los tubos se colocaron a -80 °C durante al menos 15 minutos. Las muestras se retiraron y se añadieron 150 µl de tampón de mouturación (Sarkosil 1%, sacarosa 0.25 M, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, ARNasa A 0.5 µg/µl). Los sedimentos se resuspendieron con una breve agitación, seguido por la adición de 40 µl de NaCl 5M. Las muestras se agitaron brevemente, seguido por la adición de 66 µl de CTAB 5% (bromuro cetil trimetilamonio) y una agitación breve final. Las muestras se incubaron después a 65°C durante 10 minutos después de lo cual se centrifugaron a 14,000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se extrajo una vez con 300 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico a 12:12:1, seguido por la centrifugación durante 5 minutos a 14,000 x g. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 0.7 vol de isopropanol (~ 190 µl), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos o toda la noche a 4 °C. El ADN se recuperó a través de la centrifugación a 14,000 x g durante 10 minutos. El precipitado resultante se lavó dos veces con 70% etanol, seguido de un lavado final con 100% etanol. Los sedimentos se secaron al aire durante 20-30 minutos a temperatura ambiente, seguido de la resuspensión en 50 µl de TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8.0).

50 Cinco µl del ADN de algas total, preparados como se describió anteriormente, se diluyó 1:50 en 10 mM Tris, pH 8.0. Las reacciones PCR, el volumen final de 20 µl, se fijaron de la siguiente manera. Diez µl de la mezcla maestra iProof HF 2 x (BIO-RAD) se añadieron a 0.4 µl del cebador SZ02613 (5'-TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC-3' (sec. con núm. de ident.: 9) a una concentración patrón de 10 mM). Esta secuencia del cebador corre de la posición 567-588 en el núm. de acceso L43357 del Gen Bank y está altamente conservada en los genomas de plantas superiores y plastidios de algas. Esto se siguió con la adición de 0.4 µl del cebador SZ02615 (5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (sec. con núm. de ident.: 10) a la concentración patrón de 10 mM). Esta secuencia del cebador es complementaria a la posición de 1112-1093 en el núm. de acceso L43357 del Gen Bank y es muy conservada en los genomas de plantas superiores y plastidios de algas. A continuación, se añadieron 5 µl del ADN total diluido y 3.2 µl dH<sub>2</sub>O. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de la siguiente manera: 98°C, 45", 98°C, 8", 53 °C, 12", 72°C, 20" por 35 ciclos seguidos de 72°C durante 1 min y se mantuvo a 25°C. Para la purificación de los productos de la PCR, se añadieron a cada reacción 20 µl de Tris 10 mM, pH 8.0, seguido por la extracción con 40 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12: 1, la agitación y centrifugación a 14,000 x g durante 5 minutos. Las reacciones de PCR se aplicaron a columnas S-400 (GE Healthcare) y se centrifugaron durante 2 minutos a 3,000 x g. Los productos de la PCR purificados posteriormente se clonaron en TOPO en el PCR8/GW/TOPO y los clones positivos se seleccionaron en placas LB /Spec. El ADN del plásmido purificado se secuenció en las dos direcciones

usando cebadores M13 directo e inverso. En total, doce cepas de *Prototheca* se seleccionaron para tener su 23S ARNr ADN secuenciado y las secuencias se enumeran en la lista de secuencias. Un resumen de las cepas y los números del listado de secuencia se incluyen a continuación. Las secuencias se analizaron para la divergencia general a partir de la secuencia de la UTEX 1435 (sec. con núm. de ident.: 15). Surgieron dos pares (UTEX 329/UTEX 1533 y UTEX 329/UTEX 1440) como los de máxima divergencia. En ambos casos, el alineamiento de pares resultó en 75.0% de identidad de secuencia por pares. El porcentaje de identidad de secuencia con UTEX 1435 también se incluyó más abajo:

Especie	Cepa	% identidad nt	sec. con núm. de ident.
<i>Prototheca kruegani</i>	UTEX 329	75.2	sec. con núm. ident.: 11
<i>Prototheca wickerhamii</i>	UTEX 1440	99	sec. con núm. ident.: 12
<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 1442	75.7	sec. con núm. ident.: 13
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 288	75.4	sec. con núm. ident.: 14
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1439; 1441; 1435; 1437	100	sec. con núm. ident.: 15
<i>Prototheca wickerhamii</i>	UTEX 1533	99.8	sec. con núm. ident.: 16
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1434	75.9	sec. con núm. ident.: 17
<i>Prototheca zopfii</i>	UTEX 1438	75.7	sec. con núm. ident.: 18
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1436	88.9	sec. con núm. ident.: 19

Las muestras de lípidos de un subconjunto de las cepas enumeradas anteriormente se analizaron para el perfil lipídico usando HPLC. Los resultados se muestran más abajo en la Tabla 11.

Tabla 11. Diversidad de cadenas de lípidos en especies de *Prototheca*

Cepa	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
UTEX 327	0	12.01	0	0	50.33	17.14	0	0	0
UTEX 1441	1.41	29.44	0.70	3.05	57.72	12.37	0.97	0.33	0
UTEX 1435	1.09	25.77	0	2.75	54.01	11.90	2.44	0	0

El aceite extraído de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 (a través de extracción por solvente o usando una prensa expulsora se analizó para los carotenoides, clorofila, tocoferoles, otros esteroides y tocotrienoles. Los resultados se resumen más abajo en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de carotinoide, clorofila, tocoferol/esteroides y tocotrienol en el aceite extraído de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435).

	Aceite prensado (mcg/ml)	Aceite extraído del solvente (mcg/ml)
cis-Luteína	0.041	0.042
trans-Luteína	0.140	0.112
trans-Zeaxantina	0.045	0.039
cis-Zeaxantina	0.007	0.013
t-alfa-Critoxantina	0.007	0.010
t-beta-Critoxantina	0.009	0.010
t-alfa-Caroteno	0.003	0.001
c-alfa-Caroteno	ninguno detectado	ninguno detectado
t-beta-Caroteno	0.010	0.009
9-cis-beta-Caroteno	0.004	0.002
Licopeno	ninguno detectado	ninguno detectado
<b>Total de Carotenoides</b>	<b>0.267</b>	<b>0.238</b>
Clorofila	<0.01 mg/kg	<0.01 mg/kg
<b>Tocoferoles y Esteroides</b>		
	Aceite prensado (mg/100g)	Aceite extraído del solvente (mg/100g)
gamma Tocoferol	0.49	0.49
Campesterol	6.09	6.05
Stigmasterol	47.6	47.8
Beta-sitosterol	11.6	11.5
Otros esteroides	445	446

(continuación)

<b>Tocotrienoles</b>		
	Aceite prensado (mg/g)	Aceite extraído del solvente (mg/g)
alfa Tocotrienol	0.26	0.26
beta Tocotrienol	< 0.01	< 0.01
gamma Tocotrienol	0.10	0.10
delta Tocotrienol	< 0.01	< 0.01
<b>Total de Tocotrienoles</b>	<b>0.36</b>	<b>0.36</b>

El aceite extraído de *Prototheca moriformis*, de cuatro lotes separados, se refinó y blanqueó usando métodos estándar de procesamiento de aceites vegetales. En resumen, el aceite crudo extraído de *Prototheca moriformis* se clarificó en un decantador horizontal, donde los sólidos se separaron del aceite. El aceite aclarado después se transfirió a un tanque con ácido cítrico y agua y se dejó asentar por aproximadamente 24 horas. Después de 24 horas, la mezcla en el tanque formó 2 capas separadas. La capa del fondo estaba compuesta de agua y gomas que después se eliminaron por decantación antes de transferir el aceite desengomado en el tanque de blanqueo. El aceite después se calentó junto con otra dosis de ácido cítrico. La arcilla de blanqueo después se añadió al tanque de blanqueo y la mezcla se calentó adicionalmente al vacío con el fin de evaporar cualquier agua que estaba presente. La mezcla después se bombeó a través de un filtro de hojas con el fin de eliminar la arcilla de blanqueo. El aceite filtrado después se pasó a través de un filtro de pulido final de 5µm y después se recogió para almacenamiento hasta el uso. El aceite refinado y blanqueado (RB) después se analizó para carotenoides, clorofila, esteroides, tocotrienoles y tocoferoles. Los resultados de estos análisis se resumen en la Tabla 13 más abajo. "Nd" denota ninguno detectado y la sensibilidad de la detección se enumera más abajo:

**Sensibilidad de la detección**

Carotenoides (mcg/g) nd = &lt;0.003 mcg/g

Clorofila (mcg/g) nd = &lt;0.03 mcg/g

Esteroides (%) nd = 0.25%

Tocoferoles (mcg/g); nd = 3 mcg/g

Tabla 13. El análisis de carotenoides, clorofila, esteroides, tocotrienoles y tocoferol de aceite de *Prototheca moriformis* refinado y blanqueado

	<b>Lote A</b>	<b>Lote B</b>	<b>Lote C</b>	<b>Lote D</b>
<b>Carotenoides (mcg/g)</b>				
Luteína	0.025	0.003	ND	0.039
Zeaxantina	ND	ND	ND	ND
cis-luteína/zeaxantina	ND	ND	ND	ND
trans-alfa-criptoxantina	ND	ND	ND	ND
trans-beta-criptoxantina	ND	ND	ND	ND
trans-alfa-caroteno	ND	ND	ND	ND
cis-alfa-caroteno	ND	ND	ND	ND
trans-beta-caroteno	ND	ND	ND	ND
cis-beta-caroteno	ND	ND	ND	ND
Licopeno	ND	ND	ND	ND
No identificado	0.219	0.066	0.050	0.026
<b>Total de Carotenoides</b>	<b>0.244</b>	<b>0.069</b>	<b>0.050</b>	<b>0.065</b>
<b>Clorofila (mcg/g)</b>				
Clorofila A	0.268	0.136	0.045	0.166
Clorofila B	ND	ND	ND	ND
<b>Clorofila Total</b>	<b>0.268</b>	<b>0.136</b>	<b>0.045</b>	<b>0.166</b>
<b>Esteroides (%)</b>				
Brassicasterol	ND	ND	ND	ND
Campesterol	ND	ND	ND	ND
Stigmasterol	ND	ND	ND	ND
Beta-sitosterol	ND	ND	ND	ND
<b>Esteroides Totales</b>	ND	ND	ND	ND
<b>Tocoferoles (mcg/g)</b>				
alpha-tocoferol	23.9	22.8	12.5	8.2
beta-tocoferol	3.72	ND	ND	ND
gamma-tocoferol	164	85.3	43.1	38.3

(continuación)

delta-tocoferol	70.1	31.1	18.1	14.3
<b>Tocoferoles Totales</b>	<b>262</b>	<b>139.2</b>	<b>73.7</b>	<b>60.8</b>
<b>Tocotrienoles (mcg/g)</b>				
alfa-Tocotrienol	190	225	253	239
beta-Tocotrienol	ND	ND	ND	ND
gamma-Tocotrienol	47.3	60.4	54.8	60.9
delta-Tocotrienol	12.3	16.1	17.5	15.2
<b>Total de Tocotrienoles</b>	<b>250</b>	<b>302</b>	<b>325</b>	<b>315</b>

Los mismos cuatro lotes de aceite de *Prototheca moriformis* se analizaron además para los elementos traza y los resultados se resumen más abajo en la Tabla 14.

Tabla 14. Análisis elemental de aceite refinado y blanqueado de *Prototheca moriformis*.

	<b>Lote A</b>	<b>Lote B</b>	<b>Lote C</b>	<b>Lote D</b>
<b>Análisis Elemental (ppm)</b>				
Calcio	0.08	0.07	< 0.04	0.07
Fósforo	< 0.2	0.38	< 0.2	0.33
Sodio	< 0.5	0.55	< 0.5	< 0.5
Potasio	1.02	1.68	< 0.5	0.94
Magnesio	< 0.04	< 0.04	< 0.04	0.07
Manganeso	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Hierro	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Zinc	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Cobre	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Azufre	2.55	4.45	2.36	4.55
Plomo	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Silicio	0.37	0.41	0.26	0.26
Níquel	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Cloruro orgánico	< 1.0	< 1.0	< 1.0	2.2
Cloruro inorgánico	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0
Nitrógeno	4.4	7.8	4.2	6.9
Litio	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Boro	0.07	0.36	0.09	0.38
Aluminio	--	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Vanadio	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<b>Color de Lovibond (°L)</b>				
Rojo	5.0	4.3	3.2	5.0
Amarillo	70.0	70.0	50.0	70.0
<b>Mono &amp; Diglicéridos por HPLC (%)</b>				
Diglicéridos	1.68	2.23	1.25	1.61
Monoglicéridos	0.03	0.04	0.02	0.03
Ácidos grasos libres (FFA)	1.02	1.72	0.86	0.83
Jabones	0	0	0	
<b>Triglicéridos Oxidados y Polimerizados</b>				
Triglicéridos Oxidados (%)	3.41	2.41	4.11	1.00
Triglicéridos Polimerizados (%)	1.19	0.45	0.66	0.31
Valor del peróxido (meg/kg)	0.75	0.80	0.60	1.20
Valor de p-Anisidina (adimensional)	5.03	9.03	5.44	20.1
<b>Agua y otras impurezas (%)</b>				
Humedad Karl Fisher	0.8	0.12	0.07	0.18
Compuestos polares totales	5.02	6.28	4.54	5.23
Materia no saponificable	0.92	1.07	0.72	1.04
Impurezas insolubles	< 0.01	< 0.01	0.01	< 0.01
<b>Aceite Total (%)</b>				
Aceite neutro	98.8	98.2	99.0	98.9

**EJEMPLO 2: Métodos generales para transformación biolística de *Prototheca***

Los microportadores Seashell Gold de 550 nanómetros se prepararon de acuerdo con el protocolo del fabricante. El plásmido (20 µg) se mezcló con 50 µl del amortiguador de unión y 60 µl (30 mg) de los portadores de oro S550d y se incubaron en hielo durante 1 min. El amortiguador de precipitación (100 µl) se añadió, y la mezcla se incubó en hielo durante 1 min. Después de agitación, las partículas de ADN recubiertas se sedimentaron por rotación a 10,000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415C durante 10 segundos. El precipitado de oro se lavó una vez con 500 µl de etanol frío al 100%, se sedimentó por rotación breve en la microcentrífuga, y se resuspendió con 50 µl de etanol helado. Después de una breve (1-2 seg) sonicación, 10 µl de partículas de ADN recubiertas se trasladaron de inmediato a la membrana transportadora.

Las cepas de *Prototheca* se cultivaron en medio proteosa (2g/l de extracto de levadura, 2.94mM de NaNO<sub>3</sub>, 0.17mM de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.3mM de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.4mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.28mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.43mM de NaCl) con 2% de glucosa en un agitador giratorio hasta alcanzar una densidad celular de 2x10<sup>6</sup> células/ml. Las células se cosecharon, se lavaron una vez con agua destilada estéril, y se resuspendieron en 50 µl del medio. 1 x 10<sup>7</sup> células se dispersaron en el tercer centro de una placa de medio proteosa no selectivo. Las células se bombardearon con el sistema biolístico de entrega de partículas PDS-1000/He (Bio-Rad). Se usaron los discos de ruptura (1350 psi) y las placas se colocaron 6 cm por debajo del ensamblaje del tamiz/macro-transportador. A las células se les permitió recuperarse a 25°C durante 12-24 h. Tras la recuperación, las células se rasparon de las placas con una espátula de goma, se mezclaron con 100 µl de medio y se dispersaron en las placas que contenían la selección de antibióticos adecuada. Después de 7-10 días de incubación a 25 °C, las colonias que representan las células transformadas eran visibles en las placas. Las colonias se recogieron y se mancharon en placas de agar (antibiótico o fuente de carbono) selectivas para una segunda vuelta de selección.

**EJEMPLO 3: Transformación de *Chlorella***Construcción del vector

Un fragmento BamHI-SacII que contenía el promotor CMV, un ADNc de resistencia a la higromicina, y un CMV 3' UTR (sec. con núm. de ident.: 152, una subsecuencia del vector pCAMBIA1380, Cambia, Canberra, Australia) se clonó en los sitios BamHI y SacII de pBluescript y es referido en la presente descripción como pHyg.

Transformación biolística de *Chlorella*

Los portadores de oro S550d de Seashell Technology se prepararon de acuerdo con el protocolo del fabricante. El plásmido pHyg linealizado (20 µg) se mezcló con 50 µl de tampón de unión y 60 µl (30 mg) de los portadores de oro S550d y se incubaron en hielo por 1 min. El amortiguador de precipitación (100 µl) se añadió, y la mezcla se incubó en hielo durante 1 min. Después de agitación, las partículas de ADN recubiertas se sedimentaron por rotación a 10,000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415C durante 10 segundos. El precipitado de oro se lavó una vez con 500 µl de etanol frío al 100%, se sedimentó por rotación breve en la microcentrífuga, y se resuspendió con 50 µl de etanol helado. Después de una breve (1-2 seg) sonicación, 10 µl de partículas de ADN recubiertas se trasladaron de inmediato a la membrana transportadora.

El cultivo de *Chlorella protothecoides* (Colección de cultivos de la universidad de Texas 250) se cultivó en medio proteosa (2g/l de extracto de levadura, 2.94mM de NaNO<sub>3</sub>, 0.17mM de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.3mM de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.4mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.28mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.43mM de NaCl) en un agitador giratorio bajo luz continua a 75 µmol fotones m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> hasta que se alcanza una densidad celular de 2x10<sup>6</sup> células/ml. Las células se cosecharon, se lavaron una vez con agua destilada estéril, y se resuspendieron en 50 µl del medio. 1 x 10<sup>7</sup> células se dispersaron en el tercer centro de una placa de medio proteosa no selectivo. Las células se bombardearon con el sistema biolístico de entrega de partículas PDS-1000/He (Bio-Rad). Se usaron los discos de ruptura (1100 y 1350 psi) y las placas se colocaron 9 y 12 cm por debajo del ensamblaje tamiz/macro-transportador. A las células se les permitió recuperarse a 25°C durante 12-24 h. Tras la recuperación, las células se rasparon de las placas con una espátula de goma, se mezclaron con 100 µl del medio y se dispersaron en las placas que contenían higromicina (200 µg/ml). Después de 7-10 días de incubación a 25 °C, las colonias que representan las células transformadas eran visibles en las placas a partir de los discos de ruptura de 1100 y 1350 psi y a partir de 9 y 12 cm de distancia. Las colonias se recogieron y se aplicaron en forma de puntos en placas de agar selectivo para una segunda ronda de selección.

Transformación de *Chlorella* por electroporación

El cultivo de *Chlorella protothecoides* se cultivó en medio proteosa en un agitador giratorio bajo luz continua a 75 µmol fotones m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> hasta que se alcanza una densidad celular de 2x10<sup>6</sup> células/ml. Las células se cosecharon, se lavaron una vez con agua destilada estéril, y se resuspendieron en un tampón de tris-fosfato (20m M Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM fosfato de potasio) que contenía 50 mM de sacarosa a una densidad de 4x10<sup>8</sup> células/ml. Aproximadamente 250 µl de la suspensión celular (1x10<sup>8</sup> células) se colocaron en una cubeta de electroporación

desechable de 4 mm de gap. A la suspensión celular, se añadieron 5 µg del ADN del plásmido pHyg linealizado y 200 µg del portador de ADN (ADN de esperma de salmón). La cubeta de electroporación se incubó después en un baño de agua a 16°C durante 10 minutos. Un pulso eléctrico (1100 V/cm) después se aplicó a la cubeta a una capacitancia de 25 µF (no se usó resistencia de derivación para la electroporación) por medio del uso de un aparato de electroporación Gene Pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA). La cubeta después se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, después de lo cual la suspensión de células se transfirió a 50 ml de medio de proteosa, y se agitaron en un agitador rotatorio durante 2 días. Después de la recuperación, las células se cosecharon por centrifugación a baja velocidad, se resuspendieron en medio proteosa, y se sembraron a baja densidad en placas suplementadas con 200 µg/ml de higromicina. Las placas se incubaron bajo luz continua a 75 µmol fotones m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup>. Los transformantes aparecieron como colonias en 1 – 2 semanas. Las colonias se recogieron y se aplicaron en forma de puntos en placas de agar selectivo para una segunda ronda de selección.

#### Genotipado

Un subconjunto de colonias que sobrevivió una segunda vuelta de selección se cultivó en pequeño volumen y se cosechó. Las bolillas de aproximadamente 5-10 ul de volumen se resuspendieron en 50 ul de 10mM NaEDTA mediante agitación vigorosa y después se incubaron a 100°C por 10. Los tubos se agitaron después vigorosamente brevemente y se sonicaron por 10 segundos, y después se centrifugaron a 12,000 x g por 1 minuto. 2 ul de sobrenadante como patrón se usó en una reacción PCR de 50 ul. Los cebadores usados para el genotipado fueron la sec. con núm. de ident.: 153 y la sec. con núm. de ident.: 154. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C 5 min x 1 ciclo; 95°C 30 seg - 58°C 30 seg - 72°C 1 min 30 seg x 35 ciclos; 72°C 10 min x 1 ciclo. El fragmento esperado de 992 bp se encontró en 6 de 10 colonias del método biolístico y de una sola colonia de electroporación. Una banda no específica de menor tamaño, estaba presente en todos los carriles. Para confirmar la identidad del fragmento amplificado de 992bp, dos bandas biolísticas y la banda de electroporación se extirparon del gel y se secuenciaron individualmente. La secuencia de las tres bandas correspondió al fragmento esperado de 992 bp. (escala de ADN: Bionexus® All Purpose Hi-Lo® DNA ladder catálogo núm. BN2050).

#### **EJEMPLO 4: Promotores y genes derivados de algas para su uso en microalgas**

##### **A. Secuencias de promotores y 5'UTR de *Chlorella protothecoides***

Una genoteca de ADNc se generó a partir de *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) que se cultivó mixotróficamente usando de técnicas estándar. En base a las secuencias de ADNc, las secuencias de los cebadores se diseñaron en ciertos genes domésticos conocidos, para "caminar" corriente arriba de las regiones de codificación mediante el uso del kit de ADN Walking de Seegene (Rockville, MD). Las secuencias aisladas incluyen una actina (sec. con núm. de ident.: 155) y el promotor del factor de elongación-1a (EF1a) (sec. con núm. de ident.: 156)/UTR, los cuales contienen intrones (como se muestra en minúscula) y exones (mayúsculas en cursiva) y el sitio de inicio predicho (en negrita) y dos elementos del promotor de la beta-tubulina/UTR: Isoforma A (sec. con núm. de ident.: 157) e Isoforma B (sec. con núm. de ident.: 158).

##### **B. Enzimas de la biosíntesis de lípidos y las secuencias dirigidas a los plastidios de *C. protothecoides***

A partir de la genoteca de ADNc descrita anteriormente, tres ADNc que codifican proteínas funcionales en el metabolismo de los lípidos en *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) se clonaron mediante el uso de los mismos métodos descritos anteriormente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para una acil ACP desaturasa (sec. con núms. de ident.: 159 y 160) y dos geranyl geranyl difosfato sintasas (sec. con núms. de ident.: 161-164) se incluyen en la lista de secuencias más abajo. Además, tres ADNc con la secuencia señal putativa dirigida a los plastidios se clonaron también. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (sec. con núm. de ident.: 165 y 166), una proteína compleja de desprendimiento de oxígeno OEE33 (sec. con núm. de ident.: 167 y 168) y una proteasa Clp (sec. con núm. de ident.: 169 y 170) se incluyeron en la lista de secuencias más abajo. La secuencia putativa dirigida a plastidio se subrayó, tanto en la secuencia de nucleótidos como de aminoácidos. Las secuencias dirigidas a plastidios se pueden usar para dirigir los productos de los transgenes a los plastidios de los microbios, tales como las enzimas de modificación de lípidos.

#### **EJEMPLO 5: Ingeniería genética de *Chlorella protothecoides* para expresar una sacarosa invertasa exógena**

Cepas y Medio: *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) se obtuvo de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX, Estados Unidos). Los cultivos de alimentación se mantuvieron en medio proteosa modificado. El medio proteosa modificado consiste de 0.25 g NaNO<sub>3</sub>, 0.09 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.175 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.025 g, 0.025 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.075 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, y 2 g de extracto de levadura por litro (g/l).

Construcción del plásmido: Para expresar la forma secretada de invertasa en *Chlorella protothecoides*, un gen de *Saccharomyces cerevisiae* SUC2 se colocó bajo el control de tres promotores diferentes: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CMV), promotor del virus de *Chlorella* (NC-1A), y promotor HUP1 de *Chlorella*. Un gen SUC2 de levadura se sintetizó para acomodar el uso de codones optimizado por *C. protothecoides* e incluye una secuencia señal requerida para dirigir la secreción extracelular de la invertasa. Cada constructo se construyó en

pBluescript KS+, y los sitios EcoRI/Ascl, Ascl/XhoI, y XhoI/BamHI se introdujeron a cada promotor, al gen invertasa, y el CMV 3'UTR, respectivamente, mediante la amplificación por PCR por medio del uso de cebadores específicos. Los productos de PCR se clonaron secuencialmente.

5 Transformación de *Chlorella protothecoides*: Un cultivo de *Chlorella protothecoides* se cultivó en medio de proteosa modificado en un agitador giratorio con luz continua a  $75 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  hasta que alcanzaron una densidad celular de  $6 \times 10^6$  células/ml.

10 Para la transformación biolística, los portadores de oro S550d de Seashell Technology se prepararon de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, un constructo linealizado (20  $\mu\text{g}$ ) por BsaI se mezcló con 50  $\mu\text{l}$  de tampón de unión y 60  $\mu\text{l}$  (3 mg) de los portadores de oro S550d y se incubó en hielo por 1 min. El amortiguador de precipitación (100  $\mu\text{l}$ ) se añadió, y la mezcla se incubó en hielo durante 1 min. Después de una agitación suave, las partículas recubiertas de ADN se agruparon por rotación a 10,000 rpm en una microcentrifuga Eppendorf por 10 segundos. El precipitado de oro se lavó una vez con 500  $\mu\text{l}$  de etanol frío al 100%, se sedimentó por rotación breve  
15  $\mu\text{l}$  de partículas de ADN recubiertas se trasladaron de inmediato a la membrana transportadora. Las células se cosecharon, se lavaron una vez con agua destilada estéril, se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  del medio ( $1 \times 10^7$  células), y se dispersaron en el tercer centro de una placa de Proteous no selectiva. Las células se bombardearon con el sistema biolístico de entrega de partículas PDS-1000/He (Bio-Rad). Se usaron los discos de ruptura (1100 y 1350 psi) y las placas se colocaron 9-12 cm por debajo del ensamblaje tamiz/macro-transportador. A las células se les permitió recuperarse a 25°C por 12-24 horas. Tras la recuperación, las células se rasparon de las placas con una espátula de goma, se mezclaron con 100  $\mu\text{l}$  de medio y se dispersaron en las placas de proteosa modificada con 1% de sacarosa. Después de 7-10 días de incubación a 25°C en la oscuridad, las colonias que representan las células transformadas eran visibles en las placas.

25 Para la transformación con electroporación, las células se cosecharon, se lavaron una vez con agua destilada estéril, y se resuspendieron en un tampón de Tris- fosfato (20m M Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM de fosfato de potasio) que contenía 50 mM de sacarosa a una densidad de  $4 \times 10^8$  células/ml. Aproximadamente 250  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular ( $1 \times 10^9$  células) se colocaron en una cubeta de electroporación desechable de 4 mm de gap. A la suspensión celular, se añadieron 5  $\mu\text{g}$  de ADN del plásmido linealizado y 200  $\mu\text{g}$  of ADN portador (ADN de esperma de salmón). La cubeta de electroporación después se incubó en un baño de agua helada a 16 °C durante 10 min. Un pulso eléctrico (1100 V/cm) después se aplicó a la cubeta a una capacitancia de 25  $\mu\text{F}$  (no se usó resistencia de derivación para la electroporación) por medio del uso de un aparato de electroporación Gene Pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA). La cubeta después se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, después de lo cual la suspensión de células se transfirió a 50 ml de medio de proteosa modificado, y se agitaron en un agitador rotatorio durante 2 días. Después de la recuperación, las células se cosecharon a baja velocidad (4000 rpm), se resuspendieron en medios proteosa modificado, y se sembraron a baja densidad en placas de proteosa modificada con 1% de sacarosa. Después de 7-10 días de incubación a 25°C en la oscuridad, las colonias que representan las células transformadas eran visibles en las placas.

40 Tamizaje y genotipado de los transformantes: Las colonias se recogieron de las placas de proteosa modificada crecidas en la oscuridad con 1% de sacarosa, y aproximadamente la misma cantidad de células se transfirieron a placas de 24 pocillos que contenían 1 ml de medio proteosa líquido modificado con 1% de sacarosa. Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad y se agitaron mediante un agitador orbital de Labnet (Berkshire, UK) a 430 rpm durante 5 días.

50 Para verificar la presencia del gen de la invertasa introducido en los transformantes de *Chlorella*, el ADN de cada transformante se aisló y se amplificó con un conjunto de cebadores de genes específicos (el constructo CMV: cebador directo (caaccacgtcttcaaagcaa) (sec. con núm. de ident.: 153)/ cebador reverso (tccggtgtgttgaagtcca) (sec. con núm. de ident.: 171), los constructos CV : cebador directo (ttgtcgaatgtcatatcaa) (sec. con núm. de ident.: 172)/ cebador reverso (tccggtgtgttgaagtcca) (sec. con núm. de ident.: 171), y el constructo HUP1: cebador directo (AACGCCTTTGTACAACTGCA) (sec. con núm. de ident.: 173)/ cebador reverso (tccggtgtgttgaagtcca) (sec. con núm. de ident.: 171)). Para el rápido aislamiento de ADN, un volumen de células (aproximadamente 5-10  $\mu\text{l}$  de tamaño) se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de 10 mM de Na-EDTA. La suspensión células se incubó a 100°C durante 10 min y se sonicó durante 10 seg. Después de la centrifugación a 12000g por 1 min, 3  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se usó para la reacción de la PCR. La amplificación por PCR se realizó en el ciclador térmico de ADN (Perkin-Elmer GeneAmp 9600). La mezcla de reacción (50  $\mu\text{l}$ ) contenía 3  $\mu\text{l}$  del ADN extraído, 100 pmol de cada uno de los respectivos cebadores descritos anteriormente, 200  $\mu\text{M}$  de dNTP, 0.5 unidades de la polimerasa de ADN Taq (NEB), y el amortiguador de la polimerasa de ADN Taq de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La desnaturalización del ADN se llevó a cabo a 95°C durante 5 min para el primer ciclo, y después durante 30 sec. Las reacciones de hibridación y extensión se llevaron a cabo a 58°C durante 30 seg y 72°C durante 1 min respectivamente. Los productos de la PCR se visualizaron después en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio.

65 Crecimiento en cultivo líquido: Después de cinco días de crecimiento en la oscuridad, los transformantes de genotipo positivo mostraron un crecimiento en medio proteosa líquido mínimo + 1% de sacarosa en la oscuridad,

mientras que las células silvestres no mostraron crecimiento en los mismos medios en la oscuridad.

#### **EJEMPLO 6: Transformación de cepas de algas con una invertasa secretada derivada de *S. cerevisiae***

5 Invertasa secretada : Un gen que codifica una sacarosa invertasa secretada (núm. de acceso al Genbank NP\_012104 a partir de *Saccharomyces cerevisiae*) se sintetizó nueva como un fragmento Asc I-Xho de 1599 bp que posteriormente se subclonó en un derivado de pUC19 que poseía el promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor y la 3' UTR como casetes EcoR I/Asc I y Xho/Sac I, respectivamente.

10 Crecimiento de las células de algas: El medio usado en estos experimentos fue medio base líquido (2g/l extracto de levadura, 2.94mM de NaNO<sub>3</sub>, 0.17mM de CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.3mM de MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.4mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.28mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.43mM de NaCl) y medio base sólido (+ 1.5% agarosa) que contenía carbono fijas o en forma de sacarosa o glucosa (según se diseñe) a 1% de concentración final. Las cepas que se usaron en este experimento no crecieron en la oscuridad en el medio base en ausencia de una fuente de carbono fija adicional. Las especies se sembraron sobre las placas, y se cultivaron en la oscuridad a 28°C. Las colonias individuales se seleccionaron y se usaron para inocular 500 ml de medio base líquido que contenía 1 % de glucosa se dejaron crecer en la oscuridad hasta fase semilogarítmica, se midieron los conteos de células cada día. Cada una de las siguientes cepas se probaron previamente para el crecimiento en la oscuridad en sacarosa como única fuente de carbono y no exhibieron crecimiento, y así se escogieron para la transformación con una invertasa secretada: (1) *Chlorella protothecoides* (UTEX 31); (2) *Chlorella minutissima* (UTEX 2341); y (3) *Chlorella emersonii* (CCAP 211/15).

25 Transformación de células de algas a través de bombardeo de partículas: suficiente cultivo se centrifugó para dar aproximadamente 1-5 x 10<sup>8</sup> células totales. El sedimento resultante se lavó con el medio base sin añadir ninguna fuente de carbono fijo. Las células se centrifugaron de nuevo y el sedimento se resuspendió en un volumen de medio base suficiente para dar 5 x 10<sup>7</sup> a 2 x 10<sup>8</sup> células/ml. Después 250-1000 µl de células se sembraron en medio base sólido suplementado con 1% de sacarosa y se dejaron secar sobre la placa en una campana estéril. El ADN del plásmido se precipitó sobre partículas de oro de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Seashell Technology, La Jolla, CA). Las transformaciones se llevaron a cabo por medio del uso de un sistema de entrega de partículas BioRad PDS He-1000 por medio del uso de los discos de ruptura de 1350 psi con el ensamblaje del macroportador fijado en 9cm del soporte del disco de ruptura. Después de las transformaciones, las placas se incubaron en la oscuridad a 28°C. Todas las cepas generaron múltiples colonias transformantes. Las placas de control transformadas sin el inserto de invertasa, pero por lo demás preparadas de una manera idéntica, no contenían colonias.

35 Análisis de los transformantes de *Chlorella protothecoides*: El ADN genómico se extrajo a partir de células silvestres y las colonias transformantes de *Chlorella protothecoides* de la siguiente manera: Las células se resuspendieron en 100 µl del amortiguador de extracción (87.5 mM Tris Cl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% de SDS) y se incubaron a 60°C, con mezclado ocasional por la vía de la inversión, por 30 minutos. Para la PCR, las muestras se diluyeron 1:100 en 20 mM Tris Cl, pH 8.0.

40 El genotipado se realizó en el ADN genómico extraído de las WT, los transformantes y el ADN de plásmido. Las muestras se genotiparon para el gen marcador. Se usaron los cebadores 2383 (5' CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGC 3') (sec. con núm. de ident.: 174) y 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCTG 3') (sec. con núm. de ident.: 175) en esta PCR para genotipar. El perfil de la PCR usado fue de la siguiente manera: desnaturalización a 94°C durante 5 min; 35 ciclos de 94°C -30 seg, 60°C - 30 seg, 72°C -3 min; 72°C -5 min. Una banda de tamaño idéntico se amplificó a partir de los controles positivos (plásmido) y dos transformantes de *Chlorella protothecoides* (UTEX 31).

50 Análisis de los transformantes de *Chlorella minutissima* y *Chlorella emersonii*: El ADN genómico se extrajo a partir de *Chlorella* WT y los transformantes de la siguiente manera: Las células se resuspendieron en 100 µl de amortiguador de extracción (87.5 mM Tris Cl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% SDS) y se incubaron a 60°C, con mezclado ocasional por la vía de la inversión, durante 30 minutos. Para la PCR, las muestras se diluyeron 1:100 en 20 mM Tris Cl, pH 8.0. El genotipado se realizó en el ADN genómico extraído de las WT, los transformantes y el ADN del plásmido. Las muestras se genotiparon para el gen marcador. Los cebadores 2336 (5' GTGGCCATATGGACTTACAA 3') (sec. con núm. de ident.: 176) y 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTTGTCTG 3') (sec. con núm. de ident.: 175) fueron un conjunto cebador designado 2 (1215 bp producto esperado), mientras que los cebadores 2465 (5' CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG 3') (sec. con núm. de ident.: 177) y 2470 (5' CACCCGTCGTCATGTTACGGAGCCAGTGCG 3') (sec. con núm. de ident.: 178) fueron un conjunto cebador designado 4 (1442 bp producto esperado). El perfil de PCR usado fue de la siguiente manera: 94°C desnaturalización por 2 min; 29 ciclos de 94°C -30 seg, 60°C - 30 seg, 72°C - 1 min, 30 seg; 72°C -5 min. Un plásmido control que contenía la invertasa secretada se usó como una PCR control.

65 La secuencia del constructo de invertasa corresponde a la sec. con núm. de ident.: 8.

**EJEMPLO 7: Recombinación homóloga en especies de *Prototheca***

La recombinación homóloga de transgenes tiene muchas ventajas. En primer lugar, la introducción de transgenes, sin recombinación homóloga puede ser impredecible, porque no hay control sobre el número de copias del plásmido que se introduce en la célula. Además, la introducción de transgenes, sin recombinación homóloga puede ser inestable debido a que el plásmido puede permanecer episomal y se pierde en las divisiones celulares posteriores. Otra de las ventajas de la recombinación homóloga es la capacidad de "desactivación" de genes dianas, de introducir epítipo etiquetas, cambiar promotores de genes endógenos y otro tipo de modificaciones de genes diana (por ejemplo, la introducción de mutaciones puntuales).

Dos vectores se construyeron por medio del uso de una región específica del genoma de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), designada KE858. KE858 es un fragmento genómico de 1.3 kb, que abarca parte de la región codificante para una proteína que comparte homología con la familia del ARN de transferencia (ARNt) de las proteínas. La transferencia de tipo Southern demostró que la secuencia KE858 estaba presente en una sola copia en el genoma de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435). El primer tipo de vector que se construyó, designado SZ725 (sec. con núm. de ident.:179), consistió en el fragmento de 1.3 kb KE858 completo clonado en un esqueleto del vector pUC19 que además contenía el gen optimizado de la levadura invertasa (*suc2*). El fragmento KE858 contenía un sitio único SnaB1 que no aparecía en ningún otro lugar en el constructo objetivo. El segundo tipo de vector que se construyó, designado SZ726 (sec. con núm. de ident.: 80), consistió en la secuencia KE858 que se interrumpió por la inserción del gen de la levadura invertasa (*suc2*) en el sitio SnaB1 dentro de la secuencia genómica KE858. El fragmento de ADN que contiene las secuencias KE858 que flanquean el gen levadura invertasa se puede escindir del esqueleto del vector mediante digestión con EcoRI, que corta en cada extremo de la región KE858.

Ambos vectores se usaron para dirigir la recombinación homóloga del gen (*suc2*) de invertasa de la levadura en la región KE858 correspondiente del genoma de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435). Los extremos del ADN lineal homólogo a la región genómica que era el objetivo de la recombinación homóloga se expusieron por digestión del constructo del vector SZ725 con SnaB1 y el constructo del vector SZ726 con EcoRI. Los constructos del vector digerido se introdujeron después en cultivos de *Prototheca moriformis* usando los métodos descritos anteriormente. Los transformantes de cada constructo del vector se seleccionaron después usando placas de sacarosa. Diez transformantes independientes, clonalmente puros de cada vector de transformación se analizaron para la recombinación exitosa del gen de la levadura invertasa en el lugar del genoma que se deseaba (mediante el uso de la transferencia de tipo Southern) y para la estabilidad del transgén.

El análisis de transferencia de tipo Southern de los transformantes SZ725 mostró que 4 de los 10 transformantes recogidos para el análisis contenían las bandas recombinantes previstas, lo que indicaba que un único evento de cruce se produjo entre la secuencias KE858 en el vector y las secuencias KE858 en el genoma. Por el contrario, los diez transformantes SZ726 contenían las bandas recombinantes previstas, lo que indicaba que se produjeron eventos de doble cruce entre el fragmento EcoRI de pSZ726 que portaba la secuencia KE858 que flanqueaba el transgén de la levadura invertasa y la región KE858 correspondiente del genoma.

La expresión de sacarosa invertasa y la estabilidad del transgén se evaluaron por el crecimiento de los transformantes por más de 15 generaciones en ausencia de la selección. Los cuatro transformantes SZ725 y los diez transformantes SZ726 que dieron positivo para el transgén por transferencia de tipo Southern se seleccionaron y 48 colonias individuales de cada uno de los transformantes se cultivaron en serie: en primer lugar sin selección en medio con glucosa y luego con la selección de los medios que contenían sacarosa como la única fuente de carbono. Los diez transformantes SZ276 (100%) mantuvieron su capacidad de crecer en sacarosa al cabo de 15 generaciones, mientras que aproximadamente 97% de los transformantes SZ725 conservaron su capacidad de crecer en sacarosa al cabo de 15 generaciones. Los transgenes que se introdujeron por un evento de cruce doble (vector SZ726) tienen una estabilidad muy alta durante el doblaje de las generaciones. En cambio, los transgenes que se introdujeron por un solo cruce (vector SZ725) pueden dar lugar a cierta inestabilidad durante el doblaje de las generaciones porque se introdujeron copias en tándem de los transgenes, las regiones homólogas repetidas que flanquean los transgenes se pueden recombinar y eliminar del ADN transgénico que se encontraba entre ellos.

Estos experimentos demuestran el uso exitoso de la recombinación homóloga para generar transformantes de *Prototheca* que contengan un gen heterólogo de la sacarosa invertasa que esté integrado de forma estable en los cromosomas nucleares del organismo. El éxito de la recombinación homóloga permite otras alteraciones genómicas en *Prototheca*, incluidas las supresiones de genes, las mutaciones puntuales y el epítipo etiquetado de un producto génico deseado. Estos experimentos demuestran también el primer sistema documentado para la recombinación homóloga en el genoma nuclear a de un microalga eucariota.

**Uso de la recombinación homóloga para el knockout de un gen endógeno de *Endogenous Prototheca moriformis*:** En un tamizaje de ADNc/genómico de *Prototheca moriformis*, como el descrito anteriormente en el Ejemplo 4, se identificó el ADNc. de una esteroil ACP desaturasa (SAPD) endógena. Las enzimas esteroil ACP desaturasas forman parte de la vía de síntesis de los lípidos y tienen la función de introducir dobles enlaces en las cadenas de acil graso. En algunos casos, puede ser una ventaja desactivar o reducir la

expresión de enzimas de la ruta de los lípidos con el fin de modificar un perfil de ácidos grasos. Una construcción de recombinación homóloga se creó para evaluar si la expresión de una enzima endógena esteroil ACP desaturasa se podía reducir (o desactivar) y si se podía observar la correspondiente reducción de los ácidos grasos insaturados en el perfil lipídico de la célula hospedera. Una secuencia codificante de aproximadamente 1.5kb de un gen de esteroil ACP desaturasa de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) se identificó y se clonó (sec. con núm. de ident.: 181). La construcción de recombinación homóloga se construyó mediante el uso de 0.5kb de la secuencia codificante de SAPD en el extremo 5' (sitio de dirección 5'), seguida del promotor de la  $\beta$ -tubulina de *Chlamydomonas reinhardtii* que conducía un gen *suc2* de la sacarosa invertasa de levadura con codón optimizado, con 3' UTR de *Chlorella vulgaris*. El resto (~ 1 kb) de la secuencia codificante de la SAPD de *Prototheca moriformis* se insertó entonces, después de la 3'UTR de *C.vulgaris* para conformar el sitio diana 3'. La secuencia para este casete de recombinación homóloga se enumera en la sec. con núm. de ident.: 182. Como se mostró anteriormente, la tasa de éxito para la integración del casete de recombinación homóloga en el genoma nuclear se puede aumentar mediante la linealización del casete antes de la transformación de las microalgas, dejando los extremos expuestos. El casete de recombinación homóloga dirigida a una enzima SAPD endógena en *Prototheca moriformis* se linealizó y luego se transformó en la célula hospedera (*Prototheca moriformis*, UTEX 1435). Una integración exitosa eliminaría del genoma del hospedero la región de codificación de la enzima SAPD endógena a través de un evento de doble recombinación recíproca, mientras que la expresión del nuevo gen *suc2* insertado se regularía por el promotor de la  $\beta$ -tubulina de *C.reinhardtii*. Los clones resultantes se pueden examinar mediante el uso placas/medios que contengan sacarosa como única fuente de carbono. Los clones que contengan una integración exitosa del casete de recombinación homóloga tendrán la capacidad de crecer en sacarosa como única fuente de carbono y los cambios en la saturación global de los ácidos grasos en el perfil lipídico servirá como factor de confirmación secundaria. Además, los ensayos de transferencia de tipo Southern que usen una sonda específica para el gen *suc2* de la sacarosa invertasa de levadura y la RT-PCR también podrán confirmar la presencia y expresión del gen de la invertasa en los clones positivos. Como alternativa, la misma construcción sin el promotor de la  $\beta$ -tubulina se puede usar para cortar la región de codificación de la enzima SAPD endógena. En este caso, el gen *suc2* de la sacarosa invertasa de levadura recién incorporado, será regulado por el promotor de la SAPD endógena/5'UTR.

#### EJEMPLO 8: Expresión de varias tioesterasas en *Prototheca*

Los métodos y efectos para expresar un gen de tioesterasa heterólogo en especies de *Prototheca* se describieron previamente en la solicitud PCT núm. PCT/US2009/66142, incorporada por este medio como referencia. Se investigó además el efecto de otros productos de genes/gen de tioesterasa de especies de plantas superiores. Estas tioesterasas incluyen tioesterasas de las siguientes plantas superiores:

Especies	GenBank Núm. de acceso	Especificidad	sec. con núm. de ident.:
<i>Cinnamomum camphora</i>	Q39473	C14	sec. con núms. de ident.: 30-31
<i>Umbellularia californica</i>	Q41635	C10-C12	sec. con núms. de ident.: 34-35
<i>Cuphea hookeriana</i>	AAC49269	C8-C10	sec. con núms. de ident.: 32-33
<i>Cuphea palustris</i>	AAC49179	C8	sec. con núms. de ident.: 36-37
<i>Cuphea lanceolata</i>	CAB60830	C10	sec. con núms. de ident.: 38-39
<i>Iris germanica</i>	AAG43858.1	C14	sec. con núms. de ident.: 40-41
<i>Myristica fragrans</i>	AAB717291.1	C14	sec. con núms. de ident.: 42-43
<i>Cuphea palustris</i>	AAC49180	C14	sec. con núms. de ident.: 44-45
<i>Ulmus americana</i>	AAB71731	amplio	sec. con núms. de ident.: 46-47

En todos los casos, cada uno de los constructos de tioesterasa anteriores se transformó en *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) usando el bombardeo de partículas biolístico. Otros métodos de transformación que incluyen recombinación homóloga como está descrito en la solicitud PCT núm. PCT/US2009/66142, serían adecuados también para la expresión heteróloga de genes de interés. La transformación de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) con cada uno de los constructos de tioesterasa anteriores se realizó usando los métodos descritos en el Ejemplo 2. Cada uno de los constructos contenía un gen NeoR y la selección para los clones positivos se llevó a cabo usando 100  $\mu$ g/ml G418. Todas las regiones se optimizaron por codón para reflejar la preferencia codónica inherente en los genes nucleares de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 (ver la Tabla 2). Tanto las secuencias de aminoácido y las secuencias de ADNc para el constructo usado se enumeran en la lista de identidad de secuencias. El péptido de tránsito para cada una de las tioesterasas de plantas superiores se reemplazó con un péptido de tránsito de algas optimizado por codón a partir de la desaturasa de ácido graso delta 12 de *Prototheca moriformis* (sec. con núm. de ident.: 48)) o a partir de la esteroil ACP desaturasa de *Chlorella protothecoides* (sec. con núm. de ident.: 49). Todos los constructos de tioesterasas se impulsaron por el promotor/5'UTR de la beta-tubulina de *Chlamydomonas reinhardtii*. El crecimiento y producción de lípido de los clones positivos seleccionados se compararon con los de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) silvestre (no transformados). Los clones positivos seleccionados y silvestres se cultivaron en placas G418 de 2% glucosa. El análisis de los perfiles de lípido en los clones positivos seleccionados para cada constructo se resumen más abajo (expresado en % en área) en la Tabla 15.

Tabla 15. Perfiles de lípido de *Prototheca moriformis* que expresan varias tioesterasas heterólogas.

Ácido graso	UTEX 1435 Tipo silvestre	Tioesterasa								
		<i>U. californica</i>	<i>C. camphora</i>	<i>I. germanica</i>	<i>M. fragrans</i>	<i>C. palustris</i> C8:0	<i>C. hookeriana</i>	<i>C. lanceolata</i>	<i>C. palustris</i> C14:0	<i>U. americana</i>
C8:0	0	0	0	0		3.1	1.8	0	0	.09
C10:0	0.02	.07	.02	.01	.09	.56	6.85	1.91	.01	2.85
C12:0	0.05	14	1.82	.09	.05	.25	.2	.29	.06	.74
C14:0	1.65	3	17.3	2.59	5.31	1.45	1.8	1.83	2.87	10.45
C16:0	28.0	21.4	24.3	26.52	31.08	22.84	23.9	25.55	27.23	33.3
C18:0	2.9	2.9	2.7	3.11	2.71	3.24	2.8	3.26	3.62	3.47
C18:1	53.8	45.2	41.3	49.96	39.77	56.62	49.8	55.43	51.04	38.71
C18:2	10.95	10	9.7	11.86	14.17	8.24	9.7	8.17	10.81	7.38
C18:3 □	0.8	.86	.8	.40	.64	.61	.9	.58	.97	.52
Saturados totales (área %)	32.62	44.97	46.14	32.32	39.24	31.44	37.35	32.84	33.79	50.9

Los resultados demuestran que todas las tioesterasas expresaron perfiles de ácido graso impactados en algún nivel. Al mirar la hilera de "saturados totales", el grado de saturación estuvo extremadamente impactado por la expresión de varias de las tioesterasas, que incluyen aquellas de *U. californica*, *C. camphora*, y más notablemente, *U. americana*. Estos cambios en el porcentaje los saturados totales fueron inesperados en lo que respecta a que la expresión heteróloga de las tioesterasas de plantas superiores pueden aparentemente afectar más que sólo las longitudes de las cadenas de lípidos; además pueden afectar otros atributos de los perfiles de lípidos producidos por la microalga, concretamente el grado de saturación de los ácidos grasos.

Los clones seleccionados transformados con tioesterasa C8 de *C. palustris*, tioesterasa de *C. hookeriana*, tioesterasa de *U. californica* y *C. camphorase* cultivaron adicionalmente en cantidades variables de G418 (de 25 mg/l a 50 mg/l) y a temperaturas variables (de 22°C a 25°C) y el perfil lipídico se determinó por estos clones. La Tabla 16 resume el perfil lipídico (en % e área) de los clones representativos que contienen cada tioesterasa. Un segundo constructo que contenía la tioesterasa de *U. americana* se construyó y transformó en *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) usando los métodos biolísticos descritos anteriormente. Este segundo constructo se introdujo en la célula a través de la recombinación homóloga. Los métodos para la recombinación homóloga en especies de *Prototheca* se describieron previamente en la solicitud PCT núm. PCT/US2009/66142. El ADN homólogo que se usó fue de la secuencia de ADN genómico de 6S ARNr de *Prototheca moriformis* UTEX 1435. El agente de selección tuvo la capacidad de crecer en sacarosa, usando un gen *suc2* optimizado por codón de *S. cerevisiae* impulsado por el promotor de la beta tubulina *C. reinhardtii*. El péptido de tránsito de *U. americana* natural se reemplazó por el péptido de tránsito de la estearoil ACP desaturasa de *Chlorella protothecoides* (UTEX 250). El ADNc de este constructo se enumera en la lista de secuencias como la sec. con núm. de ident.: 50. La selección de clones positivos se realizó en placas de 2% de sacarosa y los cultivos resultantes para la determinación del perfil lipídico se cultivó también en medio conteniendo 2% de sacarosa. Un perfil lipídico representativo para esta cepa de *Prototheca moriformis* que contiene tioesterasa de *U. americana* homológamente recombinada heteróloga se resume en la Tabla 16.

Tabla 16. Perfiles de lípido de cepas de *Prototheca moriformis* que contienen genes de tioesterasa heterólogos.

	<i>C. palustris</i> C8	<i>C. hookeriana</i>	<i>C. camphora</i>	<i>U. americana</i> 2
C8:0	12.28	2.37	0	0
C10:0	2.17	12.09	0.02	4.69
C12:0	0.34	0.33	3.81	1.02
C14:0	1.59	2.08	32.73	16.21
C16:0	15.91	20.07	24.03	38.39
C18:0	1.59	1.57	1.21	2.83
C18:1	50.64	41.80	18.64	27.22

(continuación)

	<i>C. palustris</i> C8	<i>C. hookeriana</i>	<i>C. camphora</i>	<i>U. americana</i> 2
<b>C18:2</b>	13.02	16.37	16.57	7.65
<b>C18:3 <math>\alpha</math></b>	1.52	1.75	1.66	0.74
<b>Saturados totales</b>	33.88	38.51	61.80	63.14

Como con los clones descritos anteriormente, todos los transformantes que contienen un gen de tioesterasa heterólogo mostraron perfiles de ácido graso impactados en algún nivel, y el porcentaje total de ácidos grasos saturados también cambió comparado con *Prototheca moriformis silvestre (no transformada)*. La *Prototheca moriformis* que contiene la tioesterasa *U. americana* introducida por recombinación homóloga tuvo el incremento más grande de saturados totales.

Además, los clones transgénicos que contienen la tioesterasa de *C. hookeriana*, *C. camphora*, *U. californica* o *U. americana* exógena se evaluaron para nuevos perfiles lipídicos. El clon que contiene la tioesterasa de *C. hookeriana* alcanzó el siguiente perfil lipídico cuando se cultivó en 2% de glucosa, 25mg/ml G418 a 22°C: 5.10% C8:0; 18.28% C10:0; 0.41% C12:0; 1.76% C14:0; 16.31% C16:0; 1.40% C18:0; 40.49% C18:1; y 13.16% C18:2. El clon que contiene la tioesterasa de *C. camphora* (además conteniendo una sacarosa invertasa exógena) alcanzó el siguiente perfil lipídico cuando se cultivó en 2% de sacarosa a 25°C: 0.04% C10:0; 6.01% C12:0; 35.98% C14:0; 19.42 C16:0; 1.48% C18:0; 25.44% C18:1; y 9.34% C18:2. El clon que contiene la tioesterasa de *U. californica* alcanzó el siguiente perfil lipídico cuando se cultivó en 2% de glucosa, 25-100 mg/ml G418 a 22°C: 0% C8:0; 0.11% C10:0; 34.01% C12:0; 5.75% C14:0; 14.02% C16:0; 1.10% C18:0; 28.93% C18:1; y 13.01% C18:2. El clon que contiene la tioesterasa de *U. americana* alcanzó el siguiente perfil lipídico cuando se cultivó en 2% de glucosa a 28°C: 1.54% C10:0; 0.43% C12:0; 7.56% C14:0; 39.45% C16:0; 2.49% C18:0; 38.49% C18:1; y 7.88% C18:2.

### EJEMPLO 9: Transformación de *Prototheca* con múltiples genes de tioesterasa heterólogos exógenos

La cepa de microalgas *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) se transformó usando los métodos descritos anteriormente para expresar múltiples tioesterasas en un solo clon. La expresión de múltiples tioesterasas en un solo clon permite que las microalgas produzcan aceites con perfiles de ácido graso completamente diferentes de aquellos elaborados cuando cualquier tioesterasa sencilla se expresa sola (como se demostró en los Ejemplos precedentes). La *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) se transformó primero con la tioesterasa (una tioesterasa que prefiere C14) de *Cinnamomum camphora* al mismo tiempo que un gen de sacarosa invertasa, el *suc2* a partir de *S. cerevisiae* (la selección fue la capacidad para crecer en sacarosa) por medio del uso de la recombinación homóloga. El ADN usado para este constructo de recombinación homóloga era de la región KE858 del ADN genómico de la *Prototheca moriformis* como se describió en la Sección III anteriormente. La porción relevante de este constructo se enumera en la Lista de secuencias como sec. con núm. de ident.: 51. Los clones positivos se detectaron en placas que contenían sacarosa. Un clon positivo después se re-transformó con uno de los tres casetes, cada uno codificante de la resistencia al antibiótico G418 así como una tioesterasa adicional: (1) el gen de la tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (que prefiere C8-10), sec. con núm. de ident.: 52; (2) el gen de la tioesterasa de *Umbellularia californica* (que prefiere C12), sec. con núm. de ident.: 53; o la tioesterasa de *Ulmus americana* (amplia; que prefiere C10-C16), sec. con núm. de ident.: 54. Incluidas en la lista de secuencias está la secuencia de la porción relevante de cada constructo. Los clones que expresaban los genes de ambas tioesterasas se detectaron en un medio que contenía sacarosa con 50  $\mu$ g/ml de G418. Los clones positivos se seleccionaron y crecieron y los perfiles de lípidos se ensayaron. La Tabla 17 resume el perfil de lípidos de clones positivos representativos (expresados en % del área).

Tabla 17. Perfiles lipídicos de *Prototheca moriformis* transformados con múltiples tioesterasas.

Ácido graso	UTEX 1435	UTEX 1435 + <i>C. camphora</i> TE	Fondo genético UTEX 1435 + <i>C. camphora</i> TE		
			+ <i>C. hookeriana</i> TE	+ <i>U. californica</i> TE	+ <i>U. americana</i> TE
<b>C8:0</b>	0	0	0.19	0	0.06
<b>C10:0</b>	0.02	0.02	2.16	0.07	1.87
<b>C12:0</b>	0.05	0.66	0.53	13.55	1.61
<b>C14:0</b>	1.65	10.52	7.64	8.0	14.58
<b>C16:0</b>	28.0	22.56	22.31	19.98	29.53
<b>C18:0</b>	2.9	6.67	3.23	2.24	2.93

(continuación)

Ácido graso	UTEX 1435	UTEX 1435 + <i>C. camphora</i> TE	Fondo genético UTEX 1435 + <i>C. camphora</i> TE		
			+ <i>C. hookeriana</i> TE	+ <i>U. californica</i> TE	+ <i>U. americana</i> TE
C18:1	53.8	47.78	48.54	42.55	37.3
C18:2	10.95	12.3	11.76	10.13	8.9
C18:3 $\alpha$	0.8	0.93	0.91	0.91	0.76
Saturados Totales (Área %)	32.62	40.43	36.06	43.84	50.58

Además, un clon de tioesterasa doble con tioesterasas de *C. camphora* y *U. californica* se cultivó en 2% de sacarosa que contenía medio con 50 mg/l G418 a 22°C. El perfil de ácido graso obtenido a partir de esta cepa bajo estas condiciones de crecimiento fue: C8:0 (0); C10:0 (0.10); C12:0 (31.03); C14:0 (7.47); C16:0 (15.20); C18:0 (0.90); C18:1 (30.60); C18:2 (12.44); y C18:3 $\alpha$  (1.38), con un total de saturados de 54.7.

Se produjeron clones de tioesterasa doble con dos constructos de recombinación homóloga (uno dirigido a la región 6S y el otro dirigido a la región KE858) que contenían tioesterasa de *C. camphora*. Un clon representativo positivo tuvo un perfil de ácido graso de : 0% C8:0; 0.06% C10:0; 5.91% C12:0; 43.27% C14:0; 19.63% C16:0; 0.87% C18:0; 13.96% C18:1; y 13.78% C18:2, con un total de saturados de 69.74%. Este clon tuvo un nivel C12-C14 por encima de 49%, el cual está 37 veces por encima del nivel C12-C14 en células silvestres.

Los datos anteriores mostraron que tioesterasas múltiples se podían co-expresar con éxito en microalgas. La co-expresión de tioesterasas múltiples resultó en perfiles de ácidos grasos alterados que diferían significativamente no sólo de la cepa silvestre, sino además del perfil de ácidos grasos obtenido por la expresión de una cualquiera de las tioesterasas individuales. La expresión de tioesterasas múltiples con especificidad de longitud de la cadena superpuesta puede resultar en aumentos acumulativos en los ácidos grasos específicos.

La expresión de tioesterasas heterólogas (ya sea solas o en conjunto) en *Prototheca moriformis* no sólo altera los perfiles de ácidos grasos/lípidos de la cepa huésped, sino cuando se compara con los aceites actualmente disponibles de una variedad de cultivos de semillas (Tabla 5), estos perfiles son de aceites realmente únicos que no se encuentran en ningún otro sistema disponible en la actualidad. No sólo las cepas transgénicas muestran diferencias significativas a partir de la cepa silvestre no transformada, ellas tienen perfiles muy diferentes de cualquiera de los aceites comerciales que se muestran en la Tabla 5. Como un ejemplo, ambos aceites de nuez de coco y de almendra de palma tienen niveles de ácidos grasos C8-C10 que están en el intervalo a partir de 5.5-17%. La cepa transgénica que expresa la tioesterasa que prefiere C8 de *C. palustris* o la tioesterasa que prefiere C10 de *C. hookeriana* se acumula en cualquier parte de 3.66 a 8.65%, respectivamente. Estos niveles de ácidos grasos C8-C10 son similares a los del aceite de nuez de coco y de almendra de palma, sin embargo, las cepas de algas transgénicas carecen de los ácidos grasos significativamente mayores de C12:0, y que tienen muy alto C16:0 (23% en transgénicos vs. 11-16% en aceite de nuez de coco y de almendra de palma, respectivamente y/o 18:1 (50-57% en transgénicos vs. 8-19% en aceite de nuez de coco y de almendra de palma, respectivamente).

## EJEMPLO 10: Identificación de promotores endógenos de *Prototheca* dependientes de nitrógeno

### A. Identificación y caracterización de los promotores endógenos dependientes de nitrógeno.

Una genoteca de ADNc se generó a partir de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) mediante el uso de técnicas estándar. Las células de *Prototheca moriformis* se cultivaron durante 48 horas en condiciones abundantes de nitrógeno. Entonces un inóculo de 5% (v/v) se transfirió a bajo nitrógeno y las células se cosecharon cada 24 horas durante siete días. Después de aproximadamente 24 horas en cultivo, el suministro de nitrógeno en el medio se agotó por completo. Las muestras que se recolectaron se congelaron de inmediato mediante el uso de hielo seco e isopropanol. El ARN total se aisló posteriormente de las muestras de sedimento de células congeladas y una porción de cada muestra se mantuvo en reserva para los estudios de RT-PCR. El resto del ARN total que se cosechó de las muestras se sometió a la selección de poliA. Cantidades equimolares de ARN seleccionado de poliA de cada condición se agruparon entonces, y se usaron para generar una genoteca de ADNc en el vector pcDNA 3.0 (Invitrogen). Se seleccionaron al azar alrededor de 1200 clones de la genoteca de ADNc resultante que se agruparon y se sometieron a secuenciación en ambas cadenas. Aproximadamente 68 ADNc diferentes se seleccionaron entre las 1200 secuencias y se usaron para diseñar los cebadores específicos del ADNc para su uso en estudios de RT-PCR en tiempo real.

El ARN que se aisló de las muestras de sedimentos de células que se reservaron, se usó como sustrato en los estudios de RT-PCR en tiempo real que usaron el conjunto de cebadores específicos del ADNc que se generaron anteriormente. Esta reserva de ARN se convirtió en ADNc y se usó como sustrato para la RT-PCR para cada uno del conjunto de 68 cebadores específicos del gen. El ciclo umbral o los números  $C_T$  se usaron para indicar la relativa abundancia de transcripción de cada uno de los 68 ADNc dentro de cada muestra de ARN que se colectó a lo largo del tiempo. Los ADNc que mostraron un aumento significativo (más de tres veces) entre las condiciones de abundante de nitrógeno y nitrógeno empobrecido se identificaron como posibles genes cuya expresión se reguló de forma ascendente por el agotamiento de nitrógeno. Como se discutió en la especificación, el agotamiento/la limitación de nitrógeno, se conoce que es un inductor de la lipogénesis en microorganismos oleaginosos.

Con el fin de identificar las secuencias putativas de los promotores/5'UTR del ADNc cuya expresión se reguló de forma ascendente durante el agotamiento/limitación de nitrógeno, el ADN total se aisló de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) que crecieron en condiciones abundantes de nitrógeno y se sometieron a secuenciación mediante el uso de la tecnología de secuenciación 454 (Roche). Los ADNc marcados como que se regulan de forma ascendente según los resultados de RT-PCR anteriores, se compararon mediante el uso de BLAST contra los cóntigos ensamblados que provenían de lecturas de la secuenciación 454 del genoma. Los extremos 5' del ADNc se correlacionaron con cóntigos específicos, y de ser posible, más de 500bp del flanco 5' de ADN se usó para identificar promotores/UTR putativos. La presencia de los promotores/5'UTR se confirmó posteriormente y se clonó mediante la amplificación por PCR del ADN genómico. Los extremos 5' individuales del ADNc se usaron para diseñar los cebadores 3' y los extremos 5' de los ensamblajes de los cóntigos 454 se usaron para diseñar los cebadores 5' específicos de genes.

Como un primer examen, uno de los promotores putativos, el 5'UTR/promotor aislado de Aat2 (transportador de amonio, sec. con núm. de ident.: 63), se clonó en el constructo de la tioesterasa C14 de *Cinnamomum camphora* con el péptido de tránsito de la esteroil ACP desaturasa de *Chlorella protothecoides*, reemplazando el promotor de la glutamato deshidrogenasa de *C.sorokinana*. Este constructo se enumera como sec. con núm. de ident.: 81. Para probar el promotor putativo, el constructo de tioesterasa se transformó en las células de *Prototheca moriformis* para confirmar la real actividad del promotor por la detección de un aumento de los ácidos grasos C14/C12 bajo condiciones de bajo/sin nitrógeno, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente. Las pruebas similares para los promotores putativos que se regulan con nitrógeno que se aíslan a partir de la detección del ADNc/genoma, se pueden hacer mediante el uso de los mismos métodos.

Otros 5'UTR/promotores regulados por nitrógeno putativos que se aislaron a partir de la detección del ADNc/genoma fueron:

5'UTR/promotor	sec. con núm. ident..	veces de aumento
5'UTR/promotor FatB/A	sec. con núm. ident.: 55	n/a
5'UTR/promotor NRAMP transportador de metales	sec. con núm. ident.: 56	9.65
5'UTR/promotor de la proteína Flap Flagelar asociada	sec. con núm. ident.: 57	4.92
5'UTR/promotor de sulfito reductasa SulfRed	sec. con núm. ident.: 58	10.91
5'UTR/promotor del transportador de azúcar SugT	sec. con núm. ident.: 59	17.35
5'UTR/promotor del transportador de amonio 03 Amt03	sec. con núm. ident.: 60	10.1
5'UTR/promotor del transportador de amonio 02 Amt02	sec. con núm. ident.: 61	10.76
5'UTR/promotor del transportador de aminoácido 01 Aat01	sec. con núm. ident.: 62	6.21
5'UTR/promotor del transportador de aminoácido 02 Aat02	sec. con núm. ident.: 63	6.5
5'UTR/promotor del transportador de aminoácido 03 Aat03	sec. con núm. ident.: 64	7.87
5'UTR/promotor del transportador de aminoácido 04 Aat04	sec. con núm. ident.: 65	10.95
5'UTR/promotor del transportador de aminoácido 05 Aat05	sec. con núm. ident.: 66	6.71

Las veces de incremento se refiere a la veces de incremento en abundancia de ADNc después de 24 horas de cultivo en medio bajo en nitrógeno.

Para obtener una mayor comprensión de la regulación potencial de estos promotor/5'UTR putativos, ocho de las secuencias se seleccionaron para probar adicionalmente: (1) FatB/A; (2) sulfito reductasa SulfRed; (3)

transportador de azúcar SugT; (4) transportador de amonio 02 Amt02; (5) transportador de aminoácido 01 Aat01; (6) transportador de aminoácido 03 Aat03; (7) transportador de aminoácido 04 Aat04; y (8) transportador de aminoácido 05 Aat05. El análisis del transcriptoma de alta resolución mediante la utilización de las lecturas de secuenciación de Illumina se llevaron a cabo en el ARN aislado a partir de células de *Prototheca moriformis* de varios puntos de tiempo: T0 (semilla); 20 horas; 32 horas; 48 horas; 62 horas; y 114 horas después de la inoculación de la semilla. El medio a T0 (semilla) estaba lleno de nitrógeno, mientras que en los puntos de tiempo de 20 horas y más largos, el medio contenía poco o nada de nitrógeno. Los cóntigos transcritos ensamblados, generados a partir de ARN aislado de cada uno de los los puntos de tiempo se compararon después de forma independiente con cada uno de los ocho transcritos previamente identificados. Los resultados se resumen en la Tabla 18 más abajo.

Tabla 18. Perfiles de expresión del transcriptoma para ocho 5'UTR/promotores putativos.

ADNc		Ts	T20	T32	T48	T62	T114
aa trans_01	absoluto	98	96	321	745	927	1300
	relativo	1	0.98	3.28	7.61	9.47	13.28
aa trans_03	absoluto	7	21	51	137	102	109
	relativo	1	2.95	7.2	19.42	14.47	15.45
aa trans_04	absoluto	1	6	25	90	131	160
	relativo	1	5.16	21.29	74.97	109.35	133.31
aa trans_05	absoluto	109	88	123	210	214	273
	relativo	1	0.81	1.13	1.93	1.97	2.51
ammon trans_02	absoluto	683	173	402	991	1413	1397
	relativo	1	0.25	0.59	1.45	2.07	2.04
fatA/B-1_cDNA	absoluto	13	36	654	617	544	749
	relativo	1	2.8	51.57	48.65	42.9	59.1
sug trans_01	absoluto	25	25	106	261	266	251
	relativo	1	1	4.22	10.4	10.63	10
sulfito reductasa_01	absoluto	634	238	138	145	163	155
	relativo	1	0.38	0.22	0.22	0.26	0.24

A partir de los resultados resumidos anteriormente, varias de los transcritos muestran aumento de la acumulación con el tiempo, aunque de manera interesante, el ARNm de la sulfito reductasa muestra una clara disminución en la acumulación de ARNm en el tiempo.

Estas ocho regiones promotor/5'UTR putativas se clonaron corriente arriba de la región codificante de la tioesterasa de *C. camphora* con su péptido de tránsito natural retirado y sustituido con el péptido de tránsito de la estearoil ACP desaturasa de *Chlorella protothecoides* (UTEX 250). Cada constructo de la región promotor/5'UTR putativa se introdujo en *Prototheca moriformis* UTEX 1435 por la vía de la recombinación homóloga por medio del uso del ADN a partir de las secuencias genómicas del 6S ARNr. Además dentro del constructo está un gen de la sacarosa invertasa *suc2* de *S. cerevisiae* para la selección de clones positivos en medio/placas que contengan sacarosa. La secuencia de ADNc para las porciones relevantes del constructo para Aat01 se enumera en la lista de secuencias como la sec. con núm. de ident.: 67. Para los otros constructos, se usó el mismo esqueleto, la única variable fue la secuencia de promotor/5'UTR putativa. Se generó una cepa transgénica de control adicional en la que el promotor de la beta tubulina de *C. reinhardtii* se usó para impulsar la expresión del gen de la tioesterasa de *C. camphora*. Este promotor ha mostrado que impulsa la expresión constitutiva del gen de interés, y así proporciona un control útil contra el cual medir la expresión del mismo mensaje de tioesterasa cuando lo impulsan varios promotores/5'UTR N-regulados putativos probados.

Una vez que se generaron los clones transgénicos, se llevaron a cabo tres experimentos separados. Los dos primeros experimentos evaluaron el potencial regulador del nitrógeno de los ocho promotores putativos al medir el estado de equilibrio de los niveles de ARNm de tioesterasa por la vía de la RT-PCR, los perfiles de ácidos grasos y los niveles de amoníaco en el sobrenadante de los cultivos. Los clones se cultivaron inicialmente a 28°C con agitación (200rpm) en medio de siembra rico en nitrógeno (1g/l nitrato amónico—15mM nitrógeno como amoníaco, 4g/l extracto de levadura) durante 24 a 48 horas, momento en el que 20 unidades de OD ( $A_{750}$ ) se usaron para inocular 50 ml de medio de bajo nitrógeno (0.2 g/l sulfato amónico—3mM nitrógeno como amoníaco, 0.2 g/l extracto de levadura). Se tomaron muestras de las células cada 24 horas durante 6 días y además se recogió una muestra antes de cambiar a las condiciones de nitrógeno bajo. Una porción de las células a partir de cada muestra se usó después para la extracción del ARN total por medio del uso del reactivo Trizol (de acuerdo con los métodos sugeridos por el fabricante). Los ensayos de amoníaco revelaron que los niveles de amoníaco en los sobrenadantes cayeron más abajo de los límites de detección (~ 100µM) después de 24 horas en medio bajo de nitrógeno.

Para la RT-PCR en tiempo real, todos los niveles de ARN se normalizaron a los niveles de un ARN de control interno expresado en *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) para cada punto de tiempo. El ARN de control interno, denominado cd189, es un producto del gen ARG9 que codifica la N-acetil ornitina aminotransferasa. Los conjuntos de cebadores usados para la RT-PCR en tiempo real en estos experimentos fueron:

5	Gen específico para <i>C. camphora</i> TE directo <i>C. camphora</i> TE inverso cd189 directo cd189 inverso	Secuencia del cebador 5'-3' TACCCCGCCTGGGGCGACAC CTTGCTCAGGCGGGTGC CCGGATCTCGGCCAGGGCTA TCGATGTCGTGCACCGTCGC	Sec. con núm. de ident.: Sec. con núm. ident.: 68 Sec. con núm. ident.: 69 Sec. con núm. ident.: 70 Sec. con núm. ident.: 71
---	---	--	--

10 Los perfiles lipídicos de cada uno de los transformantes de cada punto tiempo se generaron también y se compararon con los results de RT-PCR. Basado en los niveles de amoniaco, los resultados de RT-PCR y los cambios en los niveles de ácido graso C12-C14, se concluyó que las secuencias transportadora de aminoácido 01 (Aat-01), transportadora de aminoácido 04 (Aat-04), y transportadora de aminoácido 02 (Amt-02) si contienen un 5'UTR/promotor funcional regulatable por nitrógeno.

15 A partir de los resultados de la RT-PCR, el Aat-01 demostró la capacidad para impulsar el estado estacionario de los niveles de ARNm de la tioesterasa de *C. camphora* de hasta cuatro veces mayor que el control (promotor de la beta tubulina de *C. reinhardtii*). Los niveles de ARNm además se correlacionaron con la limitación de nitrógeno y un marcado aumento en los niveles de ácidos grasos C12-C14. Estos resultados demostraron que la 5'UTR asociada con el promotor Aat-01es probablemente más eficaz en conducir la síntesis de proteína bajo la biosíntesis de lípidos que el promotor control de *C. reinhardtii*. Como el promotor Aat-01, el promotor Aat-04 fue capaz de impulsar la acumulación de ARNm hasta cinco veces mayor que la del promotor control de *C. reinhardtii*. Sin embargo, el constructo del promotor Aat-04 sólo produjo una modesta capacidad para impactar los niveles de ácidos grasos C12-C14. Estos datos demostraron que el promotor Aat-04 es claramente regulable por agotamiento de nitrógeno, pero la UTR asociada con el promotor probablemente funcione pobremente como un potenciador de la traducción. Por último, el promotor Amt-02 fue similar al promotor Aat-01, en que fue capaz de impulsar la acumulación de ARNm hasta tres veces mayor que la del promotor control. Los niveles de ARNm además se correlacionaron con la limitación de nitrógeno y un marcado aumento en los niveles de ácidos grasos C12-C14. En conjunto, estos tres promotores demostraron ser regulados por el nitrógeno.

30 **B. Caracterización adicional del promotor del transportador de amonio 3 (amt03) y expresión de varias tioesterasas.**

35 Como se describió anteriormente, se identificaron los ADNc parciales denominados transportadores de amonio 02 y 03 (amt02 y amt03). Junto con estos dos ADNc parciales, un tercer ADNc parcial denominado transportador de amonio 01 (amt01) se identificó además. La alineación de la secuencias de aminoácidos traducidas de los ADNc parciales y putativos se compararon. Los resultados mostraron que amt01 estaba más distante en relación con las tres secuencias, mientras que amt02 y amt03 diferían sólo en un único aminoácido.

40 Los promotores/5'UTR se generaron inicialmente *in silico* al comparar las secuencias del ADNc parcial contra los ensamblajes de ADN genómico de Roche 454 y los ensamblajes de transcriptomas Illumina como se describió anteriormente. Se identificaron los cóntigos transcritos que mostraban identidad con el ADNc que codificaba amt01, amt02, y amt03, sin embargo, los cóntigos transcritos no se podían diferenciar entre los tres ARNm ya que los cóntigos contenían secuencias compartidas por los tres. Los ensamblajes de ADN genómico Roche 454 dieron los accesos a las secuencias de ADNc amt02 y amt03 y contenían secuencias N-terminal de proteínas. La PCR se llevó a cabo para clonar las regiones de flaqueo 5'. Los cebadores PCR usados para validar el promotor/UTR del clon amt02 y amt03 fueron:

Amt03 directo: 5'-GGAGGAATTTCGGCCGACAGGACGCGGTCA-3' (sec. con núm. de ident.: 85)

50 Amt03 inverso: 5'-GGAGACTAGTGGCTGCGACCGGCTGTG-3' (sec. con núm. de ident.: 86)

Amt02 directo: 5'-GGAGGAATTCTCACCAGCGGACAAAGCACCG-3' (sec. con núm. de ident.: 87)

Amt02 inverso: 5'-GGAGACTAGTGGCTGCGACCGGCTCTGG-3' (sec. con núm. de ident.: 88)

55 En ambos casos, los cebadores 5' y 3' contenían sitios de restricción para la clonación anticipada en vectores de expresión para validar la funcionalidad de estas regiones 5'UTR/promotor.

60 Se realizó el alineamiento de pares entre los ADN clonados por este método basado en la combinación de la PCR e *in silico* y el ADNc original que codifica amt02 (sec. con núm. de ident.: 61) y amt03 (sec. con núm. de ident.: 60). Los resultados de estos alineamientos mostraron diferencias significativas entre los ADNc originales y las secuencias genómicas clonadas, lo que indica que los transportadores de amonio probablemente representan una familia de genes diversa. Además, el clon del promotor/5'UTR basado en el método combinado para amt03 fue diferente de la secuencia de amt03 original, mientras que las secuencias de amt02 fueron idénticas. Experimentos adicionales para caracterizar la secuencia promotor/UTR amt03 (sec. con núm. de ident.: 89) se realizaron y describieron más abajo.

La secuencia de promotor/UTR amt03 identificada anteriormente (sec. con núm. de ident.: 89) se probó al clonar esta secuencia promotor/UTR putativa para impulsar la expresión de cuatro tioesterasas diferentes. El casete de expresión contenía secuencias de recombinación homóloga corriente arriba y corriente abajo al locus 6S del genoma (sec. con núms. de ident.: 82 y 84, respectivamente). El casete además contenía un ADNc de sacarosa invertasa de *S. cerevisiae* SUC2 para permitir la selección de clones positivos en medio que contiene sacarosa. La expresión de la sacarosa invertasa la impulsó el promotor de la beta tubulina de *C. reinhardtii* y además contenía una 3'UTR de nitrato reductasa de *C. vulgaris* la secuencia promotor/UTR amt03 después se clonó corriente abajo del casete de la sacarosa invertasa seguido por la secuencia de ADNc en marco de la tioesterasa de uno de los cuatro genes de tioesterasa de: (1) tioesterasa C14 de *C. camphora*; (2) tioesterasa C12 de *U. californica*; (3) tioesterasa C10-C16 de *U. americana*; o (4) tioesterasa C10 de *C. hookeriana* y además contenía una 3'UTR de nitrato reductasa de *C. vulgaris*. La tioesterasa C14 de *C. camphora*, la tioesterasa C12 de *U. californica*, y la tioesterasa C10-C16 de *U. americana* todas contenían el péptido de tránsito de una esteroil ACP desaturasa de *Chlorella protothecoides*. La tioesterasa C10 de *C. hookeriana* contenía el péptido de tránsito de una desaturasa de ácido graso delta 12 (FAD) de *Prototheca moriformis*. En todos los casos, las secuencias se optimizaron por codón para la expresión en *Prototheca moriformis*. Las secuencias para los constructos de tioesterasa anteriores se describen en la Lista de Secuencias:

promotor/UTR amt03::constructo de tioesterasa de <i>C. camphora</i>	sec. con núm. de ident.: 90
constructo de tioesterasa de <i>C. camphora</i>	sec. con núm. de ident.: 91
constructo de tioesterasa de <i>U. californica</i>	sec. con núm. de ident.: 92
constructo de tioesterasa de <i>U. americana</i>	sec. con núm. de ident.: 93
constructo de tioesterasa de <i>C. hookeriana</i>	sec. con núm. de ident.: 94

Las líneas transgénicas se generaron por la vía de los métodos de la transformación biolística como se describió anteriormente en el Ejemplo 2 en las células silvestres de *Prototheca moriformis* y la selección se llevó a cabo en placas/medio que contenía sacarosa. Las líneas positivas se seleccionaron después para el grado en que sus perfiles de ácidos grasos estaban alterados. Cuatro líneas, una resultante a partir de la transformación con cada uno de los cuatro constructos descritos anteriormente, después se sometieron a análisis adicional. La línea 76 expresó la tioesterasa C14 de *C. camphora*, la línea 37 expresó la tioesterasa C12 de *U. californica*, la línea 60 expresó la tioesterasa C10-C16 de *U. americana*, y la línea 56 expresó la tioesterasa C10 de *C. hookeriana*. Cada línea se cultivó durante 48 horas en medio que contenía sacarosa como única fuente de carbono y se tomaron muestras de células a las 14, 24, 36 y 48 horas (cultivo semilla) para la determinación del perfil de ácidos grasos por la vía de la transesterificación directa de ésteres metílicos de ácidos grasos y el posterior análisis por GC-FID (descrito anteriormente) y para el aislamiento del ARN total. Al final de 48 horas, estas células se usaron para inocular cultivos con niveles de bajo o ningún nitrógeno (contenía sacarosa como única fuente de carbono) mantenida a pH 5.0 (amortiguado con citrato, concentración final 0.05M) o pH 7.0 (amortiguado con HEPES, concentración final 0.1 M). Se tomaron muestras del cultivo a 12, 24, 72 y 108 horas (producción de lípidos) para el perfil de ácidos grasos y el aislamiento de ARN total. Los ensayos de amoníaco de estos cultivos revelaron que los niveles de amoníaco cayeron más abajo de los límites de detección (ca. 100  $\mu$ M) después de 24 horas en medio bajo en nitrógeno.

Los ensayos de la RT-PCR en tiempo real sobre los niveles de ARNm de las tioesterasas se realizaron en el ARN total a partir de cada uno de los puntos de tiempo recogidos anteriormente y todos los niveles de ARNm se normalizaron a los niveles de un control interno de ARN (cd189). Los conjuntos de cebadores usados en la PCR en tiempo real se muestran en la Tabla 19 más abajo:

Tabla 19. Conjuntos de cebadores para la PCR en tiempo real.		
Gen específico para	Secuencia del cebador 5'-3'	Sec. con núm. de ident.:
<i>C. camphora</i> TE directo	TACCCGCGCTGGGCGACAC	Sec. con núm. ident.: 68
<i>C. camphora</i> TE inverso	CTTGCTCAGGCGGGGTGC	Sec. con núm. ident.: 69
<i>U. californica</i> TE directo	CTGGGCGACGGCTTCGGCAC	Sec. con núm. ident.: 95
<i>U. californica</i> TE inverso	AAGTCGCGGCGCATGCCGTT	Sec. con núm. ident.: 96
<i>U. americana</i> TE directo	CCCAGCTGCTCACCTGCACC	Sec. con núm. ident.: 97
<i>U. americana</i> TE inverso	CACCCAAGGCCAACGGCAGCGCCGTG	Sec. con núm. ident.: 98

(continuación)

	<i>C. hookeriana</i> TE directo	TACCCCGCCTGGGGCGACAC	Sec. con núm. ident.: 99
5	<i>C. hookeriana</i> TE inverso	AGCTTGGACAGGCGGGGT	Sec. con núm. ident.: 100
	cd189 inverso	TCGATGTCGTGCACCGTCGC	Sec. con núm. ident.: 71
10	cd189 directo	CCGGATCTCGGCCAGGGCTA	Sec. con núm. ident.: 70

Los resultados de los perfiles de ácidos grasos en cada uno de los puntos de tiempo en la fase de cultivo semilla mostraron muy poco impacto de las tioesterasas. Con el comienzo de la fase de producción de lípidos, los perfiles de ácidos grasos se vieron afectados significativamente, con los aumentos que son mucho más dramáticos para los cultivos mantenidos a pH 7.0 en comparación con los cultivos a pH 5.0. Si bien la magnitud de la diferencia entre pH 7.0 y 5.0 varió la acumulación del ácido graso objetivo con cada tioesterasa de prueba, el efecto general fue el mismo: que las células cultivadas a pH 5.0 mostraron niveles significativamente más bajos de los ácidos grasos objetivos acumulados, pero más que en comparación con las células silvestres de control.

Análisis del ARN aislado de estas mismas muestras se correlacionó muy bien con los datos del perfil de ácido graso, en que hubo un claro impacto de pH del cultivo en los niveles de ARNm del estado estacionario para cada una de las tioesterasas. En conjunto los datos de acumulación de ácido graso y los datos de ARNm, la regulación del pH de la expresión del gen de la tioesterasa impulsada por el promotor/UTR del amt03 estaba mediada claramente ya sea a nivel de la transcripción, de la estabilidad de ARNm o ambos. Además, se observó que los niveles en equilibrio del ARNm de *U. californica* fueron cuatro logs más bajos en comparación con los niveles de estado estacionario del ARNm de *C. hookeriana*. Esta observación es consistente con la hipótesis de que las secuencias de ARNm individuales pueden desempeñar un papel en el control de la expresión. Estos datos implican que la captación de amonio en *Prototheca moriformis* por la familia de transportadores amt03 está acoplada directamente al pH.

El análisis adicional del perfil de ácidos grasos se realizó en doce líneas generadas a partir de la transformación de células de *Prototheca moriformis* con el constructo promotor/UTR amt03 que impulsa la expresión de la tioesterasa C10-C16 de *U. americana*. La línea 60, descrita anteriormente, fue una parte del siguiente análisis. La Tabla 20 más abajo muestra los perfiles de lípido de tres de las doce líneas que se analizaron junto con el control silvestre.

Tabla 20. Perfiles de ácido graso de transformantes que contienen *U. americana* TE impulsados por el UTR/promotor amt03.

Área%	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	Saturados totales
silvestre	0.00	0.01	0.04	1.27	27.20	3.85	58.70	7.18	32.36
Línea 40	2.38	20.61	3.41	28.41	29.92	1.91	8.57	3.74	86.64
<b>Línea 44</b>	1.50	20.16	4.44	31.88	26.66	1.88	6.95	5.42	86.50
<b>Línea 60</b>	0.98	14.56	3.15	27.49	31.76	2.14	12.23	6.36	80.06

Como se muestra en la tabla anterior, los niveles de saturados totales se incrementaron dramáticamente sobre el silvestre en más de 2.6 veces en el caso de la línea 40 en comparación con la silvestre (los saturados totales de las doce líneas analizadas estaban en el intervalo de aproximadamente 63% a más del 86%). Además, la tioesterasa de *U. americana*, cuando se expresó en estos niveles, redujo drásticamente el nivel de insaturados, especialmente C18:1 y C18:2 (ver las líneas 40 y 44), donde en la línea 44, los niveles de C18:1 se redujeron en más de 8 veces en comparación con la silvestre. Además, la tioesterasa de *U. americana* (impulsada por el promotor amt03) aumenta en gran medida los niveles de los ácidos grasos de media cadena. La línea 44 muestra los niveles de C10:0-C14:0 mayores que 56%, aproximadamente 42 veces mayor que los niveles observados en la cepa silvestre y los niveles de C8:0-C14:0 mayor que 57%. Cepas adicionales transformadas con un constructo del promotor Amt03 que impulsa la expresión de la tioesterasa de *U. americana* tenía el perfil de lípido representativo de: 0.23% C8:0; 9.64% C10:0; 2.62% C12:0; 31.52% C14:0; 37.63% C16:0; 5.34% C18:0; 7.05% C18:1; y 5.03% C18:2, con un porcentaje total de saturados a 86.98%.

Los perfiles de lípidos adicionales generados a partir de la transformación de las células de *Prototheca moriformis* con el constructo promotor/UTR amt03 (sec. con núm. de ident.: 89) que impulsa la expresión de la tioesterasa C10 de *C. hookeriana* (sec. con núm. de ident.: 94). Los clones positivos que expresaban este constructo se seleccionaron y se cultivaron en condiciones de pH 7.0. El perfil de lípido representativo de un clon positivo fue: 9.87% C8:0; 23.97% C10:0; 0.46% C12:0; 1.24% C14:0; 10.24% C16:0; 2.45% C18:0; 42.81% C18:1; y

7.32% C18:2. Este clon tuvo un porcentaje de C8-C10 de 33.84

En conjunto, los datos sugieren que el promotor/UTR amt03, y otros promotores similares, se pueden usar como un promotor estrictamente regulado, lo que puede ser particularmente útil para expresar un compuesto potencialmente tóxico y para el control riguroso de la expresión génica que se requiere. La capacidad de *Prototheca moriformis* para crecer bajo una amplia variedad (al menos pH 5.0 a 7.0) regímenes de pH hace este organismo particularmente útil en conjunto con elementos reguladores tales como el promotor/UTR amt03. Además, los datos del perfil de lípidos anteriores demuestran la gran capacidad del promotor/UTR amt03 para impulsar la expresión de genes.

#### EJEMPLO 11: Alteración de los niveles de ácidos grasos saturados en la microalga *Prototheca moriformis*

Como parte de un tamizaje genómico por medio del uso de un enfoque basado en la bioinformática basado en la secuenciación de los ADNc, transcriptoma Illumina y Roche 454 del ADN genómico a partir de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), dos grupos específicos de genes implicados en la desaturación de ácidos grasos se identificaron: las esteroil ACP desaturasas (SAD) y las desaturasas de ácidos grasos delta 12 ( $\Delta 12$  FAD). Las enzimas esteroil ACP desaturasas son parte de la ruta de síntesis de los lípidos y funcionan para introducir dobles enlaces en las cadenas de acilo graso, por ejemplo, la síntesis de los ácidos grasos C18:1 a partir de los ácidos grasos C18:0. Las desaturasas de ácidos grasos delta 12 son además parte de la ruta de síntesis de lípidos y funcionan para introducir dobles enlaces en los ácidos grasos ya insaturados, por ejemplo, la síntesis de los ácidos grasos C18:2 a partir de los ácidos grasos C18:1. El análisis de transferencia de tipo Southern al usar sondas basadas en las dos clases de genes de las desaturasas de ácidos grasos identificados durante los esfuerzos de bioinformática indicó que cada clase de genes de desaturasa estaba compuesto probablemente de múltiples miembros de la familia. Además los genes que codificaban las esteroil ACP desaturasas se dividían en dos familias distintas. Basándose en estos resultados, tres constructos de interrupción de genes se diseñaron para para interrumpir potencialmente múltiples miembros de la familia de genes al direccionalizar las regiones de codificación más conservadas dentro de cada familia de enzimas desaturasas.

Tres constructos de direccionalización de la recombinación homóloga se diseñaron por medio del uso de: (1) porciones altamente conservadas de la secuencia codificante de los miembros de la familia de la desaturasa de ácido graso delta 12 (d12FAD) y (2) dos constructos direccionalizados a cada una de las dos familias distintas de SAD, cada uno con regiones conservadas de las secuencias codificantes de cada familia. Esta estrategia integraría un gen marcador seleccionable (el casete de la sacarosa invertasa *suc2* a partir de *S. cerevisiae* que confiere la capacidad para hidrolizar la sacarosa) en estas regiones codificantes altamente conservadas (al direccionalizar múltiples miembros de la familia) en lugar de la estrategia clásica de reemplazo de un gen donde la recombinación homóloga estaría direccionalizada a las regiones flanqueantes del gen objetivo.

Todos los constructos se introdujeron en las células por transformación biolística por medio del uso de los métodos descritos anteriormente y los constructos se linealizaron antes de dispararse en las células. Los transformantes se seleccionaron en placas/medio que contenía sacarosa y los cambios en el perfil de lípidos se ensayaron por medio del uso del método descrito anteriormente. Las secuencias relevantes de cada una de los tres constructos de direccionalización se enumeran más abajo.

Descripción	sec. con núm. de ident.:
secuencia 5' de la región codificante de d12FAD del constructo de direccionalización	sec. con núm. de ident.: 72
secuencia 3' de la región codificante de d12FAD del constructo de direccionalización	sec. con núm. de ident.: 73
secuencia de ADNc del constructo de direccionalización d12FAD	sec. con núm. de ident.: 74
secuencia 5' de la región codificante de SAD2A	sec. con núm. de ident.: 75
secuencia 3' de la región codificante de SAD2A	sec. con núm. de ident.: 76
secuencia de ADNc del constructo de direccionalización SAD2A	sec. con núm. de ident.: 77
secuencia 5' de la región codificante de SAD2B	sec. con núm. de ident.: 78
secuencia 3' de la región codificante de SAD2B	sec. con núm. de ident.: 79
secuencia de ADNc del constructo de direccionalización SAD2B	sec. con núm. de ident.: 80

Los clones positivos representativos de las transformaciones con cada uno de los constructos se recogieron y los perfiles de lípidos de estos clones se determinaron (expresado en % del área) y se resumen en la Tabla 21 más abajo.

Tabla 21. Perfiles de lípidos para los knockouts de desaturasa.

	Ácido graso	d12FAD KO	SAD2A KO	SAD2B KO	wt UTEX 1435
	<b>C8:0</b>	0	0	0	0
5	<b>C10:0</b>	0.01	0.01	0.01	0.01
	<b>C12:0</b>	0.03	0.03	0.03	0.03
	<b>C14:0</b>	1.08	0.985	0.795	1.46
	<b>C16:0</b>	24.42	25.335	23.66	29.87
	<b>C18:0</b>	6.85	12.89	19.555	3.345
10	<b>C18:1</b>	58.35	47.865	43.115	54.09
	<b>C18:2</b>	7.33	10.27	9.83	9.1
	<b>C18:3 alfa</b>	0.83	0.86	1	0.89
	<b>C20:0</b>	0.48	0.86	1.175	0.325

15 Cada uno de los constructos tuvo un impacto medible en la clase deseada de ácido graso y en los tres casos los niveles de C18:0 aumentaron notablemente, particularmente con los dos knockouts SAD. La comparación adicional de múltiples clones a partir de los knockouts SAD indicaron que las líneas knockouts SAD2B tuvieron reducciones significativamente mayores de ácidos grasos C18:1 que los niveles de ácidos grasos C18:1 observados con las líneas knockouts SAD2A.

20 Se generaron knockouts de desaturasas de ácidos grasos  $\Delta 12$  (FAD) adicionales en un fondo de *Prototheca moriformis* por medio del uso de los métodos descritos anteriormente. Con el fin de identificar el potencial homólogo de  $\Delta 12$ FAD, los siguientes cebadores se usaron con el fin de amplificar una región genómica que codifica una FAD putativa:

Cebador 1 5'-TCACTTCATGCCGGCGGTCC-3' sec. con núm. de ident.: 101  
 Cebador 2 5'-GCGCTCCTGCTTGCTCGAA-3' sec. con núm. de ident.: 102

30 Las secuencias resultantes de la amplificación genómica del ADN genómico de *Prototheca moriformis* por medio del uso de los cebadores anteriores fueron muy similares, pero indicaron que varios genes o alelos de las FAD  $\Delta 12$  existen en *Prototheca*.

35 Basado en este resultado, se diseñaron dos constructos de interrupción de genes que buscaban desactivar uno o más de los genes  $\Delta 12$ FAD. La estrategia integraría un casete de sacarosa invertasa (*suc2* de *S. cerevisiae*), así conferir la capacidad para hidrolizar la sacarosa como un marcador seleccionable, en las regiones codificantes altamente conservadas en lugar de usar una estrategia clásica de reemplazo de genes. El primer constructo, denominado pSZ1124, contenía secuencias genómicas de direccionalización 5' y 3' que flanqueaban un promotor de la  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* para impulsar la expresión del gen *suc2* de *S. cerevisiae* y un 3'UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* (casete de *S. cerevisiae* *suc2*). El segundo constructo, denominado pSZ1125, contenía secuencias genómicas de direccionalización 5' y 3' que flanqueaban un promotor de la  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* para impulsar la expresión del gen *suc2* de *S. cerevisiae* y un 3'UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris*. Las secuencias relevantes de los constructos se enumeran en la lista de secuencias:

45 secuencia de direccionalización genómica 5' de pSZ1124 (FAD2B) sec. con núm. de ident.: 103  
 secuencia de direccionalización genómica 3' de pSZ1124 (FAD2B) sec. con núm. de ident.: 104  
 casete de *S. cerevisiae* *suc2* sec. con núm. de ident.: 105  
 50 secuencia de direccionalización genómica 5' de pSZ1125 (FAD2C) sec. con núm. de ident.: 106  
 secuencia de direccionalización genómica 3' de pSZ1125 (FAD2C) sec. con núm. de ident.: 107

55 pSZ1124 y pSZ1125 se introdujeron cada uno en un fondo de *Prototheca moriformis* y los clones positivos se seleccionaron basados en la capacidad de hidrolizar la sacarosa. La Tabla 22 resume los perfiles de lípidos (en % de área, generada por medio del uso de los métodos descritos anteriormente) obtenidos en dos líneas transgénicas en las que se usaron los vectores de direccionalización pSZ1124 y pSZ1125.

Tabla 22. Perfiles de lípidos de los knockouts de  $\Delta 12$  FAD

	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 $\alpha$
padre	0.01	0.03	1.15	26.13	1.32	4.39	57.20	8.13	0.61
FAD2B	0.02	0.03	0.80	12.84	1.92	0.86	74.74	7.08	0.33
FAD2C	0.02	0.04	1.42	25.85	1.65	2.44	66.11	1.39	0.22

El transgénico que contenía el constructo FAD2B (pSZ1124) dio un resultado muy interesante e inesperado en el perfil de lípidos, en el que los niveles de C18:2, que se esperaba que disminuyeran, sólo disminuyeron aproximadamente un % de área. Sin embargo, los niveles de ácido graso C18:1 disminuyeron significativamente, casi exclusivamente a expensas de los niveles de C16:0, que disminuyeron significativamente. El transgénico que contenía el constructo FAD2C (pSZ1125) además dio un cambio en el perfil de lípidos: los niveles de C18:2 se redujeron significativamente junto con un aumento correspondiente en los niveles de C18:1.

Sebo vacuno mimético

Un clon positivo generado a partir del experimento de knockout de SAD2B anterior como se describió anteriormente se seleccionó para usarlo como el fondo para la introducción adicional de un gen de tioesterasa ACP-acilo graso que prefiere C14. El constructo que introduce la tioesterasa que prefiere C14 de *C. camphora* contenía secuencias de direccionalización a la región genómica del 6S ARNr (que permite la integración direccionalizada del ADN transformante por la vía de la recombinación homóloga) y el constructo de expresión contenía el promotor de  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* que impulsa la expresión del gen *Rneo* con 3'UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris*, seguido por un segundo promotor de  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* que impulsa la expresión de una tioesterasa optimizada por codón de *C. camphora* con un péptido de tránsito de la estearoil ACP desaturasa de *Chlorella protothecoides* con un segundo 3'UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris*. La secuencia 5' donadora genómica del 6S ARNr se enumera en la sec. con núm. de ident.: 82; la secuencia 3' donadora genómica del 6S ARNr se enumera en la sec. con núm. de ident.: 84; y el constructo de expresión relevante para la tioesterasa de *C. camphora* se enumera en la sec. con núm. de ident.: 83.

La transformación se llevó a cabo por medio del uso de los método biolísticos como se describió anteriormente y las células se les permitió recuperarse por 24 horas en placas que contenían 2% de sacarosa. Después de este tiempo, las células se resuspendieron y re-sembraron en placas que contenían 2% de sacarosa y 50  $\mu$ g/ml de G418 para la selección. Nueve clones de los clones positivos generados se seleccionaron para la producción de lípidos y el perfil de lípidos. Los nueve clones transgénicos (con el SAD2B KO y que expresaban la tioesterasa que prefiere C14 de *C. camphora*) se cultivaron como se describió anteriormente y se analizaron para el perfil de lípidos. Los resultados se resumen más abajo en la Tabla 23. El perfil de lípidos para el sebo además se incluyó en la Tabla 23 más abajo (National Research Council 1976: El contenido y la composición de grasa de producto animal).

Tabla 23. Perfil de lípido de los clones transformados con tioesterasa.

	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20
SAD2BKO <i>C.camphora</i> TE clon 1	0.01	0.33	6.13	24.24	0.19	11.08	42.03	13.45	0.98	0.73
SAD2BKO <i>C.camphora</i> TE clon 2	0.01	0.16	3.42	23.80	0.40	9.40	50.62	10.2	0.62	0.70
SAD2BKO <i>C.camphora</i> TE clon 3	0.01	0.20	4.21	25.69	0.40	7.79	50.51	9.37	0.66	0.63
SAD2BKO <i>C.camphora</i> TE clon 4	0.01	0.21	4.29	23.57	0.31	9.44	50.07	10.07	0.70	0.70
SAD2BKO <i>C.camphora</i> TE clon 5	0.01	0.18	3.87	24.42	0.32	9.24	49.75	10.17	0.71	0.71
SAD2BKO <i>C.camphora</i> TE clon 6	0.01	0.28	5.34	23.78	0.33	9.12	49.12	10.00	0.68	0.70
SAD2BKO <i>C.camphora</i> TE clon 7	0.01	0.15	3.09	23.07	0.32	10.08	51.21	10.00	0.66	0.74
SAD2BKO <i>C.camphora</i> TE clon 8	0.01	0.29	5.33	24.62	0.37	7.02	49.67	10.74	0.69	0.70
SAD2BKO <i>C.camphora</i> TE clon 9	0.01	0.12	2.74	25.13	0.30	10.17	50.18	9.42	0.71	0.71
wt 1435	0.01	0.02	0.96	23.06	0.79	3.14	61.82	9.06	0.46	0.27
SAD2BKO Sebo	0.01	0.03	0.80	23.66	0.13	19.56	43.12	9.83	1.00	1.18
	0.00	0.00	4.00	26.00	3.00	14.00	41.00	3.00	1.00	0.00

Como se puede observar en la Tabla 23, los perfiles de lípidos de las líneas transgénicas son muy similares al perfil de lípido del sebo. En conjunto, los datos demuestran la utilidad de combinar fondos transgénicos específicos, en este caso, un knockout de SAD2B con una tioesterasa que prefiere C14 (de *C. camphora*), para generar una cepa de algas transgénica que produce aceite similar al perfil de lípido del sebo.

5 El constructo se usó para la regulación descendente de la expresión de la β-cetoacil sintetasa II (KASII) por el enfoque del knockout direccionalizado

10 El vector de regulación descendente de la expresión del gen de KASII se introdujo mediante el enfoque de knockout direccionalizado en un derivado mutado a la manera clásica de UTEX 1435, S1331. El gen de la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó como un marcador seleccionable, al conferir la capacidad de crecer en sacarosa. El casete de expresión de la invertasa bajo el control del promotor de la B-tubulina de *C. reinhardtii* se insertó en el medio de la región genómica de 315bp de largo de KASII para permitir la integración direccionalizada (pSZ1503).

15 Los sitios de restricción relevantes en el pSZ1503 se indicaron en minúscula, en negrita y subrayado y son 5'-3' *BspQ* 1, *Kpn* I, *Ascl*, *Xho* I, *Sac* I, *BspQ* I, respectivamente. Los sitios *BspQ*I delimitan los extremos 5' y 3' del ADN transformante. Las secuencias en minúscula y negrita representan el ADN genómico de S1331 que permite la integración direccionalizada en el locus KASII por la vía de la recombinación homóloga. El promotor de la B-tubulina de *C. reinhardtii* actúa en la dirección 5' a 3', e impulsa la expresión del gen de la sacarosa invertasa de levadura (al conferir la capacidad de S1331 para metabolizar la sacarosa) se indicó por el texto en el recuadro. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indicaron con mayúsculas, itálicas negritas mientras la región codificante se indicó en minúsculas itálicas. El 3' UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* se indicó por el texto en minúscula subrayado.

25 Secuencia de nucleótido del ADN transformante contenido en pSZ1503\_[KASII\_btub-y.inv-nr\_KASII]:

30 gctcttccgcaccggetggctccacccaactgaacctcgagaaccccgcgctggcgtcgaccccgctgctgctggtggg  
cgcggaaggagcgcgcgaagacctggacgtgctctccaactccttggcttggcgggcacaattcgtgctcggtacc  
cttcttgcgctatgacactccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccgcgctgcatgcaaacaccgatgatgcttcg  
acccccgaagctccttcggggctgcatgggctcgcgatgccgctccagggcgagcgcctgtttaaataagccaggcccccgattgc  
aaagacattatagcgagctacaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactc  
cgctaaggggggcgctcttctctcttctcgtttcagtcacaacccgcaaac***ggcgcgcc******ATG****ctgctgcaggccttctgttctgctgg*  
*ccgcttcgcccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgcccctggtgcacttccacccaacaagggct*  
*ggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtggcacctgtacttccagtacaacccgaacgacac*  
*cgctcgggggacgcccctgttctggggccacgccaagtccgacgacctgaccaactgggaggaccagccatcgccatgcccc*  
40 *gaagcgcgaacgactccggcgccttctccggctccatggtggtggactacaacaacacctccggettcttcaacgacaccatcgac*  
*ccgcgccagcgcgtgctggtggccatctggacctacaacacccggagtcgaggagcagtcacatctctacagcctggacggcgg*

45

50

55

60

65

ctacacctaccgagtagcagaagaaccccgtgctggccgcaactccaccagttccgacccgaaggcttctggtacgag  
 ccctccagaagtgatcatgaccgcgccaagtcaccaggactacaagatcgagatctactctccgacgacctgaagctctgg  
 aagctggagtcgctgcgcaacgagggcttctcggctaccagtagtgccccggcctgatcgaggtccccaccgagcag  
 5 gacccagcaagtcctactgggtgatgtcatctccatcaaccccggcgccccggcgggctccttcaaccagtactcgtcgg  
 cagcttcaacggcaccacctcagggccttcgacaaccagtcccgcgtgggtggacttggcaaggactactacgcccgcagacc  
 ttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgctgggctccaactgggagtagtccgcttctgcccacca  
 acccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagtttccctcaacaccgagtagcaccggcaacccggagacggagctgacaa  
 10 cctgaaggccgagccgatctgaacatcagcaacgcccggccccggagccggttcgccaccaacaccagttgacgaaggcc  
 aacagctacaacgtcgacctgtccaacagcaccggcaccctggagttcgagctgggtgacgccgtaacaccaccagacgac  
 tccaagtcggtgctcgggaccttccctcgttcaagggcctggaggaccccaggagtagctccgcagggcttcgaggtgct  
 cgctcctccttctcggaccgcggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaacaaccgcatgagcgtg  
 15 aacaaccgcccctcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtagcgttctggaccagaacatcctggagctgact  
 tcaacgacggcgagctcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgcccctgggctcctgtaacatgacgacgggg  
 gtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaagTGAcaattggcagcagcagctcggatagtagc  
 20 acactctggagcctggtcgtgtaggactgttccgcccacacttgccttgacctgtgaatatccctgccgctttatcaaacagcct  
cagtggtttgatcttgtgtgtagcgccttttgcgagttgctagctgcttctgctatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcgttt  
catatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgcctgctcctgctcctcactgcccctcgcacagc  
cttggtttggctcgcctgtattctcctgtagtcaacctgtaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggtagggga  
 acacaaatggaggatcgtagagctcatcttccgaaagtagcagcagtagcagctgattctcttggagcgggctcgggtggtt  
 25 ggggagagtgccggaaaggcgagagcgtgcccggcgctcctcctccttccctgggtggtgctatagtaacctgc  
 ctgtgctcgtgcgctcgggaagagc (SEO ID NO: 149)

Los ADNc del alelo 1 y alelo 2 de KAS II se identificaron en las sec. con núms. de ident.: 279 y 280,  
 respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los alelos 1 y 2 se identificaron en las sec. con núms. de ident.:  
 281 y 282, respectivamente.

Para determinar el impacto de la inactivación de KASII en la composición de lípido, el vector de ADN  
 pSZ1503 se transformó en S1331 para generar un fenotipo knockout de KASII direccionalizado. Los clones iniciales  
 individuales se aislaron y se cultivaron bajo condiciones estándar de producción de lípidos a pH5.0. Los perfiles  
 35 resultantes del mejor clon representativo y de las células silvestres se muestran más abajo en la Tabla 31

Tabla 31. Los perfiles de ácidos grasos en S1331 y una línea transgénica derivada transformada con el ADN de  
 Z1503.

ID Muestra	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 $\alpha$
1331-5	0.01	0.03	0.96	24.28	0.64	3.94	62.69	6.21	0.49
D698-2	0.01	0.01	0.83	38.36	1.38	2.21	48.31	7.60	0.55

**EJEMPLO 12: Modificación de *Prototheca* con marcadores seleccionables alternativos**

**A. Expresión de una  $\alpha$ -galactosidasa de secreción en *Prototheca moriformis***

Los métodos y efectos para expresar un un gen heterólogo de sacarosa invertasa en especies de  
*Prototheca* se han descrito previamente en la solicitud del PCT núm. PCT/US2009/66142, incorporada de este modo  
 como referencia. La expresión de otras enzimas de degradación de polisacáridos heterólogas se examinó en este  
 Ejemplo. Se probó la capacidad de crecer en melibiosa ( $\alpha$ -D-gal-glu) de la *Prototheca moriformis* UTEX 1435 con  
 uno de los siguientes genes exógenos codificantes de una  $\alpha$ -galactosidasa: el genMEL1 de *Saccharomyces*  
*carlbergensis* (secuencia de aminoácido correspondiente al número de acceso al NCBI, P04824 (sec. con núm. de  
 50 ident.: 108)), el gen AglC de *Aspergillus niger* (secuencia de aminoácido correspondiente al número de acceso al  
 NCBI, Q9UUZ4 (sec. con núm. de ident.: 116)), y la  $\alpha$ -galactosidasa a partir de planta superior *Cyamopsis*  
*tetragobobola* (semilla de guar) (secuencia de aminoácido correspondiente al número de acceso al NCBI, P14749  
 (sec. con núm. de ident.: 120). Los números de accesos anteriores y las secuencias de aminoácidos  
 correspondientes se incorporan de este modo como referencia. En todos los casos, los genes se optimizaron de  
 60 acuerdo con el uso de codones preferidos en *Prototheca moriformis*. Las porciones relevantes del casete de  
 expresión se enumeran más abajo junto con los números de la lista de secuencias. Todos los casetes de expresión  
 usaron las secuencias de direccionalización de la recombinación homóloga 5' y 3' Clp para la integración genómica  
 estable, el promotor/5'UTR de *Chlamydomonas reinhardtii* TUB2, y el 3'UTR de la nitrato reductasa de *Chlorella*  
*vulgaris*.

	<i>S. carlbergensis MEL1</i> secuencia de aminoácido	sec. con núm. de ident.: 108
	<i>S. carlbergensis MEL1</i> secuencia de aminoácido del péptido señal	sec. con núm. de ident.: 109
5	<i>S. carlbergensis MEL1</i> casete de transformación	sec. con núm. de ident.: 110
	<i>S. carlbergensis MEL1</i> secuencia (optimizada por codón)	sec. con núm. de ident.: 111
	secuencia de direccionalización de la recombinación homóloga de Clp 5'	sec. con núm. de ident.: 112
	secuencia de direccionalización de la recombinación homóloga de Clp 3'	sec. con núm. de ident.: 113
10	<i>Chlamydomonas reinhardtii TUB2</i> promotor/5'UTR	sec. con núm. de ident.: 114
	<i>Chlorella vulgaris</i> 3'UTR de la nitrato reductasa	sec. con núm. de ident.: 115
	secuencia de aminoácido de <i>A. niger AlgC</i>	sec. con núm. de ident.: 116
	secuencia de aminoácido del péptido señal de <i>A. niger AlgC</i>	sec. con núm. de ident.: 117
15	secuencia de <i>A. niger AlgC</i> (optimizada por codón)	sec. con núm. de ident.: 118
	casete de transformación de <i>A. niger AlgC</i>	sec. con núm. de ident.: 119
	<i>C. tetragonobola</i> secuencia de aminoácido de la $\alpha$ -galactosidasa	sec. con núm. de ident.: 120
20	secuencia de la $\alpha$ -galactosidasa de <i>C. tetragonobola</i> (optimizada por codón)	sec. con núm. de ident.: 121
	casete de transformación de la $\alpha$ -galactosidasa de <i>C. tetragonobola</i>	sec. con núm. de ident.: 122

25 Las células de *Prototheca moriformis* se transformaron con cada uno de los tres casetes de expresión que contenían el gen de la  $\alpha$ -galactosidasa de *S. carlbergensis MEL1*, *A. niger AlgC*, o *C. tetragonobola* por medio del uso de los métodos de transformación biolística como se describió en el Ejemplo 2 anterior. Los clones positivos se tamizaron por medio del uso de placas que contenían 2% de melibiosa como la única fuente de carbono. Ninguna colonia apareció en las placas para los transformantes del casete de expresión de *C. tetragonobola*. Los clones positivos se recogieron de las placas que contenían los transformantes de *S. carlbergensis MEL1* y los transformantes de *A. niger AlgC*. La integración del ADN transformante se confirmó por medio del uso de la PCR con cebadores que direccionalizaban una porción de la 3'UTR y la secuencia de direccionalización de la recombinación homóloga 3' Clp de *C. vulgaris*.

35 cebador 5' de 3'UTR de *C. vulgaris*: secuencia Clp corriente abajo (sec. con núm. de ident.: 123)  
ACTGCAATGCTGATGCACGGGA  
cebador 3' de 3'UTR de *C. vulgaris*: secuencia Clp corriente abajo (sec. con núm. de ident.: 124)  
TCCAGGTCCTTTTCGCACT

40 Como un control negativo, el ADN genómico de células no transformadas de *Prototheca moriformis* se amplificaron además con el conjunto de cebadores. Ningún producto se amplificó a partir del ADN genómico de las células silvestres.

45 Varios clones positivos de cada uno de los transformantes de *S. carlbergensis MEL1* y los transformantes de *A. niger AlgC* (como se confirmó por la PCR) se probaron para su capacidad para crecer en melibiosa como la única fuente de carbono en medio líquido. Estos clones seleccionados se cultivaron por 3 días en las condiciones y el medio base descritos en el Ejemplo 1 anterior con melibiosa como la única fuente de carbono. Todos los clones que contenían cualquiera de los genes codificantes de la  $\alpha$ -galactosidasa crecieron de manera robusta durante este tiempo, mientras que la cepa silvestre no transformada y *Prototheca moriformis* que expresa una sacarosa invertasa de *Saccharomyces cerevisiae SUC2* ambas crecieron pobremente en el medio de melibiosa. Estos resultados sugieren que los genes codificantes de la  $\alpha$ -galactosidasa se pueden usar como un marcador seleccionable para la transformación. Además, estos datos indican que los péptidos señales naturales presentes en la *S. carlbergensis MEL1* (sec. con núm. de ident.: 109) o *A. niger AlgC* (sec. con núm. de ident.: 117) son útiles para direccionalizar proteínas al periplasma en las células de *Prototheca moriformis*.

## 55 **B. Los genes THIC complementan la auxotrofia para tiamina en *Prototheca***

Se examinó la prototrofia para tiamina en células de *Prototheca moriformis* por medio del uso de la expresión de genes *THIC* exógenos. La biosíntesis de la tiamina en plantas y algas típicamente se lleva a cabo en el plastidio, por lo tanto la mayoría de las proteínas codificadas nucleares implicadas en su producción necesitarán estar direccionalizadas al plastidio eficientemente. La secuenciación del ADN y la secuenciación del transcriptoma de las células de *Prototheca moriformis* reveló que todos los genes que codifican las enzimas biosintéticas de la tiamina estaban presentes en el genoma, con la excepción de *THIC*. Para analizar la lesión responsable de la auxotrofia para tiamina a nivel bioquímico, el crecimiento de las células de *Prototheca moriformis* bajo cinco regímenes diferentes se examinaron: (1) en presencia de 2  $\mu$ M clorhidrato de tiamina; (2) sin tiamina; (3) sin tiamina, pero con 2  $\mu$ M de hidroxietilo tiazol (THZ); (4) sin tiamina, pero con 2  $\mu$ M 2-metilo-4-amino-5-(aminometil)pirimidina

(Pyr); y (5) sin tiamina, pero con 2  $\mu$ M de THZ y 2 $\mu$ M de Pyr. Los resultados de los experimentos de crecimiento bajo estas 5 condiciones diferentes indicaron que las células de *Prototheca moriformis* son capaces de la síntesis de novo, pero sólo pueden producir tiamina pirofosfato (TPP) si se proporciona el precursor Pyr. Este resultado es consecuente con la hipótesis de que la auxotrofia para tiamina de *Prototheca moriformis* se debe a la incapacidad de sintetizar fosfato de hidroximetilpirimidina (HMP-P) a partir de aminoimidazol ribonucleótido, que es la conversión catalizada por la enzima THIC.

Las células de *Prototheca moriformis* se transformaron usando los métodos de transformación biolística descritos anteriormente en el Ejemplo 2, que expresan C-169 THIC de *Coccomyxa* (la secuencia de aminoácido correspondiente a JGI proteína ID 30481, y por este medio incorporada como referencia) y un SUC2 de sacarosa invertasa de *S. cerevisiae* como marcador seleccionable. Este constructo de expresión contenía la secuencia del péptido de tránsito natural de C-169 THIC de *Coccomyxa*, secuencias corriente arriba y corriente abajo que direccionalizan la recombinación homóloga a la región 6S del ADN genómico, una región promotor/5'UTR de *C. reinhardtii TUB2* (sec. con núm. de ident.: 104), y una 3'UTR de *nitrate reductasa de Chlorella vulgaris* (sec. con núm. de ident.: 115). La expresión de *S. cerevisiae SUC2* además se impulsó por una región promotor/5'UTR de *C. reinhardtii TUB2* (sec. con núm. de ident.: 114) y contenía una 3'UTR de *nitrate reductasa de Chlorella vulgaris* (sec. con núm. de ident.: 115). Los genes se optimizaron de acuerdo con el uso de codones preferidos en *Prototheca moriformis*. Las secuencias del casete de expresión relevantes se enumeran en la lista de secuencias y se detallan más abajo:

secuencia de aminoácido de C-169 THIC de <i>Coccomyxa</i>	sec. con núm. de ident.: 125
secuencia de aminoácido del péptido de tránsito natural de C-169 THIC de <i>Coccomyxa</i>	sec. con núm. de ident.: 126
casete de transformación de C-169 THIC de <i>Coccomyxa</i>	sec. con núm. de ident.: 127
secuencia de C-169 THIC de <i>Coccomyxa</i> (optimizada por codón)	sec. con núm. de ident.: 128
secuencia de <i>S. cerevisiae SUC2</i> (optimizada por codón)	sec. con núm. de ident.: 129
secuencia de direccionalización de la recombinación homóloga de 6S 5'	sec. con núm. de ident.: 82
secuencia de direccionalización de la recombinación homóloga de 6S 3'	sec. con núm. de ident.: 84

La selección de los clones positivos se realizó en placas sin tiamina y que contenían sacarosa como la única fuente de carbono. Los clones positivos se confirmaron por medio del uso de la PCR con un cebador 5' que se une dentro del gen de *Coccomyxa C-169 THIC* y un cebador 3' que hibrida corriente abajo del ADN transformante en el locus 6S. Los clones positivos confirmado por la PCR además se confirmaron por medio del uso de ensayos de transferencia tipo Southern.

Para observar la auxotrofia para tiamina de las células silvestres de *Prototheca moriformis*, fue necesario agotar la reserva interna de tiamina de las células. Para probar el crecimiento en medio sin tiamina, las células primero se cultivaron hasta la fase estacionaria en medio que contenía 2  $\mu$ M de tiamina y después las células se diluyeron a una densidad óptica a 750 nm (OD750) de aproximadamente 0.05 en medio sin tiamina. Las células diluidas se cultivaron después una vez más hasta la fase estacionaria en medio sin tiamina (aproximadamente 2-3 días). Estas células agotadas de tiamina se usaron para inocular los cultivos para los estudios de crecimiento en medio sin tiamina. Las células silvestres se cultivaron en medio con glucosa como fuente de carbono (con o sin tiamina) y los clones positivos con el péptido de tránsito natural del constructo C-169 THIC de *Coccomyxa* se cultivaron en medio con sacarosa como la única fuente de carbono. El crecimiento se midió mediante el control de la absorbancia a 750nm. Los resultados de los experimentos de crecimiento mostraron el crecimiento considerablemente más grande en medio libre de tiamina de la cepa que expresaba el transgén en comparación con las células silvestres en medio libre de tiamina. Sin embargo, los transformantes no alcanzaron la velocidad de crecimiento y las densidades celulares de las células silvestres en medio que contenía tiamina. Además hubo una fuerte correlación entre la cantidad de crecimiento en los clones transformantes en medio libre de tiamina y el número de copias del transgén integrado de la enzima de *Coccomyxa* (es decir, a mayor número de copias del transgén, mejor crecimiento de las células en medio libre de tiamina).

Se generaron transformantes adicionales por medio del uso de constructos de expresión que contenían el *Coccomyxa THIC*, el gen *Arabidopsis thaliana THIC*, y el gen *Synechocystis sp. PCC 6803 thiC*. En el caso de *Coccomyxa* y el gen *A. thaliana THIC*, la secuencia del péptido de tránsito natural se reemplazó con la secuencia del péptido de tránsito de un gen de esteroil-ACP desaturasa (SAD) de *Chlorella protothecoides*. *Synechocystis sp.* es una cianobacteria y la proteína thiC no contiene una secuencia de péptido de tránsito natural. En el constructo *Synechocystis sp thiC*, la secuencia del péptido de tránsito de un gen SAD de *Chlorella protothecoides* se fusionó al N-terminal de la *Synechocystis sp. thiC*. En todos los casos, las secuencias se optimizaron por codón para la expresión en *Prototheca moriformis*. Los tres constructos anteriores contenían una secuencia de direccionalización de la recombinación homóloga corriente arriba y corriente abajo a la región 6S del genoma (sec. con núms. de ident.: 82 y 84), un promotor/5' UTR de actina de *Chlorella protothecoides*, y un gen 3'UTR de *Chlorella protothecoides*

5 *EF1A*. Los tres constructos contenían un gen *neoR* impulsado por el promotor/5'UTR de *C. reinhardtii TUB2* (sec. con núm. de ident.: 114) y contenía el 3'UTR de *C. vulgaris* (sec. con núm. de ident.: 115), para conferir la selección por el G418. La secuencia de aminoácido del THIC de *A. thaliana* correspondía al número de acceso al NCBI NP\_180524 y la secuencia de aminoácido de *Synechocystis sp. thiC* correspondía al número de acceso al NCBI NP\_442586, ambas secuencias de este modo incorporadas como referencia. Las secuencias del casete de expresión relevantes se enumeran en la lista de secuencias y se detallan más abajo:

10	constructo de expresión de <i>Coccomyxa THIC</i> con el péptido de tránsito de <i>C. protothecoides</i>	sec. con núm. de ident.: 130
	<i>Coccomyxa THIC</i> con el péptido de tránsito de <i>C. protothecoides</i>	sec. con núm. de ident.: 131
	<i>C. protothecoides</i> promotor/5' UTR de actina	sec. con núm. de ident.: 132
	<i>C. protothecoides EF1A</i> 3'UTR	sec. con núm. de ident.: 133
15	<i>A. thaliana THIC</i> constructo de expresión	sec. con núm. de ident.: 134
	<i>A. thaliana THIC</i> con el péptido de tránsito de <i>C. protothecoides</i>	sec. con núm. de ident.: 135
	secuencia de aminoácido THIC de <i>A. thaliana</i> con el péptido de tránsito natural	sec. con núm. de ident.: 136
20	constructo de expresión <i>Synechocystis sp. thiC</i>	sec. con núm. de ident.: 137
	<i>Synechocystis sp. thiC</i> con el péptido de tránsito de <i>C. protothecoides</i>	sec. con núm. de ident.: 138
	<i>Synechocystis sp.</i> secuencia de aminoácido de <i>thiC neoR</i> gen	sec. con núm. de ident.: 139 sec. con núm. de ident.: 140

25 Los clones positivos se tamizaron en placas que contenían G418 y varios clones a partir de cada transformación se recogieron para la verificación por la PCR. La integración de los constructos de ADN transformante que contenían el C-169 de *Coccomyxa* (con el péptido de tránsito de *C. protothecoides*), *A. thaliana* y *Synechocystis sp.* Los genes PCC 6803 *THIC*, respectivamente en el locus 6S del genoma se confirmó por medio del uso del análisis de la PCR con los siguientes cebadores:

30	secuencia del cebador de confirmación de THIC 5' de <i>Coccomyxa</i> (sec. con núm. de ident.: 141)
	ACGTCGCGACCCATGCTTCC
	secuencia del cebador de confirmación de THIC 3' (sec. con núm. de ident.: 142)
	GGGTGATCGCCTACAAGA
35	secuencia del cebador de confirmación de THIC 5' de <i>A. thaliana</i> (sec. con núm. de ident.: 143)
	CGGTCATCGCCTACAAGA
	secuencia del cebador de confirmación de <i>thiC</i> 5' de <i>Synechocystis sp.</i> (sec. con núm. de ident.: 144)
	CGATGCTGTGCTACGTGA

40 Los experimentos de crecimiento en células agotadas de tiamina (como se describió anteriormente) se realizaron usando los clones positivos confirmados seleccionados a partir de los transformantes de cada uno de los diferentes constructos en el medio que contenía G418. Todos los transformantes pudieron crecer (con diferentes grados de robustez) en el medio libre de tiamina. La comparación del crecimiento de los transformantes en el medio libre de tiamina con las células silvestres en medio que contenía tiamina mostró la siguiente clasificación con respecto a su capacidad para soportar el crecimiento en el medio libre de tiamina: (1) los transformantes de *A. thaliana*; (2) los transformantes de *Coccomyxa* C-169 (con el péptido de tránsito de *C. protothecoides*); y (3) los transformantes *Synechocystis sp.* . Estos resultados sugieren que mientras un copia única de *A. thaliana THIC* pudo complementar la auxotrofia para tiamina en las células de *Prototheca moriformis*, múltiples copias de C-169 de *Coccomyxa* (ya sea con la secuencia del péptido de tránsito natural o una secuencia de péptido de tránsito a partir de *C. protothecoides*) y *Synechocystis sp. THIC* fue necesario para permitir el crecimiento rápido en ausencia de tiamina. Dada la variabilidad en los resultados de los diferentes THIC a partir de las diferentes fuentes, la capacidad de cualquier gen *THIC* particular para complementar completamente la lesión presente en las especies de *Prototheca* no es predecible.

55 Se realizó una alineación de las tres secuencias de aminoácidos de THIC. Aunque existía una considerable conservación de secuencia entre el *thiC* de *Synechocystis sp.* en comparación con el THIC de *Coccomyxa* y *A. thaliana* (41% de identidad a nivel de aminoácido), a la proteína cianobacteriana le falta un dominio en el extremo N-terminal que está muy conservado en las proteínas de algas y plantas. A pesar del dominio faltante (y resultar presumiblemente en las diferencias estructurales), el constructo que expresa la *Synechocystis sp. thiC* fue capaz de al menos parcialmente restablecer el prototofismo para tiamina en las células de *Prototheca moriformis*.

### EJEMPLO 13: Producción de combustible

#### A. Extracción del aceite de microalgas, mediante el uso de una prensa expulsora y una presión auxiliar

65 La biomasa de microalgas que contenía 38% de aceite por DCW se secó usando un tambor secador que

5 dio lugar al contenido de humedad resultante de 5-5.5%. La biomasa se introdujo en una prensa French L250. Se introdujeron 30.4 kg (67 lbs.) de biomasa a la prensa y ningún aceite se recuperó. La misma biomasa microbiana seca se combinó con distintos porcentajes de pasto forrajero como una presión auxiliar que se introdujo a través de la prensa. La combinación de la biomasa microbiana seca y el 20% p/p del pasto forrajero rindió el mejor porcentaje de rendimiento de aceite en general. Las tortas de prensado se sometieron a extracción con hexano y el rendimiento final de la condición de 20% de pasto forrajero fue de 61.6% del aceite total disponible (calculado por peso). La biomasa por encima de 50% del peso seco de las células de aceite no requiere el uso de una presión auxiliar, como el pasto forrajero para liberar el aceite. Otros métodos de extracción de aceite a partir de microalgas por medio del uso de una prensa expulsora se describen en la solicitud de PCT núm. PCT/US2010/31108 y de este modo se incorpora como referencia.

**B. Producción de biodiesel a partir de aceite de *Prototheca***

15 El aceite desgomado de *Prototheca moriformis* UTEX 1435, que se produjo de acuerdo a los métodos que descritos anteriormente, se sometió a transesterificación para producir ésteres metílicos de ácidos grasos. Los resultados se muestran en la Tabla 24 más abajo.

El perfil de lípido del aceite fue:

20	C10:0	0.02
	C12:0	0.06
	C14:0	1.81
	C14:1	0.07
	C16:0	24.53
25	C16:1	1.22
	C18:0	2.34
	C18:1	59.21
	C18:2	8.91
	C18:3	0.28
30	C20:0	0.23
	C20:1	0.10
	C20:1	0.08
	C21:0	0.02
	C22:0	0.06
35	C24:0	0.10

Tabla 24. El perfil de biodiesel a partir del aceite triglicérido de *Prototheca moriformis*.

Método	Prueba	Resultado	Unidades		
40	ASTM D6751 A1	Filtrabilidad de impregnado en frío de mezclas combustible de biodiesel	Tiempo de filtración	120	seg.
			Volumen Filtrado	300	MI
45	ASTM D93	Punto de inflamación en vaso cerrado Pensky-Martens	Procedimiento usado	A	
			Punto de inflamación corregido	165.0	°C
45	ASTM D2709	Agua y sedimento en combustibles destilados intermedios (Método centrífuga)	Sedimento y agua	0.000	% en vol
	EN 14538	Determinación del contenido de Ca y Mg por ICP OES	Suma de ( Ca y Mg)	<1	mg/kg
50	EN 14538	Determinación del contenido de Ca y Mg por ICP OES	Suma de ( Na y K)	<1	mg/kg
	ASTM D445	Viscosidad cinemática / dinámica	viscosidad cinemática @ 104 °F/ 40 °C	4.873	mm²/s
55	ASTM D874	Ceniza sulfatada a partir de aceites lubricantes y aditivos	Ceniza sulfatada	< 0.005	% en peso
60	ASTM D5453	Determinación del azufre total en hidrocarburos ligeros, combustible para motor de ignición por chispa, combustible para motor diesel, y aceite de motor por fluorescencia ultravioleta.	Azufre, mg /kg	1.7	mg/kg
	ASTM D130	Corrosión - tira de cobre	Corrosión Cu-Biodiesel 50°C (122°F)/3 h	1a	
65	ASTM D2500	Punto de turbidez	Punto de turbidez	6	°C

(continuación)

Método	Prueba	Resultado	Unidades
ASTM D4530	Residuo de micro carbono	Promedio del residuo de carbono del micro método	< 0.10 % en peso
ASTM D664	Índice de acidez de los productos de petróleo por valoración potenciométrica	Procedimiento usado	A
		índice de acidez	0.20 mg KOH/g
ASTM D6584	Determinación de la glicerina libre y total en metil éster de Biodiesel B-100 por cromatografía de gases	Glicerina libre	< 0.005 % en peso
		Glicerina total	0.123 % en peso
ASTM D4951	Elementos aditivos en aceites lubricantes por ICP-AES	Fósforo	0.000200 % en peso
ASTM D1160	Destilación de productos de petróleo a presión reducida	IBP	248 °C
		AET @ 5% Recuperación	336 °C
		AET @ 10% Recuperación	338 °C
		AET @ 20% Recuperación	339 °C
		AET @ 30% Recuperación	340 °C
		AET @ 40% Recuperación	342 °C
		AET @ 50% Recuperación	344 °C
		AET @ 60% Recuperación	345 °C
		AET @ 70% Recuperación	347 °C
		AET @ 80% Recuperación	349 °C
		AET @ 90% Recuperación	351 °C
		AET @ 95% Recuperación	353 °C
		FBP	362 °C
		% Recuperado	98.5 %
		% pérdida	1.5 %
% Residuo	0.0 %		
Volumen de la trampa para frío	0.0 ml		
IBP	248 °C		
EN 14112	Determinación de la estabilidad de oxidación (prueba de oxidación acelerada)	Estabilidad de oxidación	>12 h
		Temp. de operación (usualmente 110 grados C)	110 °C
ASTM D4052	Densidad de líquidos por medidor de densidad digital	peso API @ 60°F	29.5 °API
ASTM D 6890	Determinación de retardo en la ignición (ID) y número de cetano derivado (DCN)	Número de cetano derivado (DCN)	> 61.0

El perfil de lípido del biodiesel fue muy similar al perfil de lípidos del aceite como materia prima. Los demás aceites que proporcionaron los métodos y las composiciones de la invención se pueden someter a transesterificación para rendir biodiesel con los perfiles de lípidos, que incluyen (a) al menos 4% C8-C14, (b) al menos 0.3% C8; (c) al menos 2% C10, (d) al menos 2% C12 y (3) al menos 30% C8-C14.

La filtrabilidad de impregnado en frío por el método ASTM D6751 A1 de producción de biodiesel, fue de 120 segundos para un volumen de 300 ml. Esta prueba consiste en la filtración de 300 ml de B100, refrigerados a 40°F durante 16 horas, se dejó calentar a temperatura ambiente, y se filtró al vacío con fibra de vidrio de 0.7 micras con soporte de acero inoxidable. Los aceites de la invención se pueden transesterificar para generar biodiesel con un

tiempo de inmersión en frío de menos de 120 segundos, menos de 100 y menos de 90 segundos.

### C. Producción de diesel renovable

5 El aceite desgomado de *Prototheca moriformis* UTEX 1435, elaborado de acuerdo a los métodos descritos anteriormente y que tenía el mismo perfil lipídico que el aceite usado para producir biodiesel en este Ejemplo, anterior, se sometió a la transesterificación para producir diesel renovable.

10 El aceite primero se trató con hidrógeno para eliminar el oxígeno y el esqueleto de glicerol, lo que produjo n-parafinas. Las n-parafinas se sometieron a craqueo e isomerización. Un cromatograma del material se muestra en la Figura 1. El material después se sometió a filtración en frío, la que eliminó aproximadamente 5% del material C18. Tras la filtración en frío el volumen total de material se redujo a punto de inflamación y se evaluó el punto de inflamación, la distribución de la destilación ASTM D-86, el punto de turbidez y viscosidad. El punto de inflamación fue de 63°C, la viscosidad fue de 2.86 cSt (centistokes), el punto de turbidez fue de 4°C. Los valores de la destilación ASTM D86 se muestran en la Tabla 25:

Tabla 25. Valores de la destilación ASTM D86.

Lecturas en °C:	
Volumen	Temperatura
IBP	173
5	217.4
10	242.1
15	255.8
20	265.6
25	277.3
30	283.5
40	286.6
50	289.4
60	290.9
70	290.9
80	294.3
90	300
95	307.7
FBP	331.5

35 La T10-T90 del material producido fue 57.9°C. Los métodos de tratamiento con hidrógeno, la isomerización, y otra modificación covalente de los aceites que se describen en la presente, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (tales como la filtración en frío) que se describen en la presente, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovables con otros intervalos T90 T10, tales como, 20 , 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 y 65 °C mediante el uso de los aceites triglicéridos que se producen de acuerdo con los métodos que se describen en la presente.

40 La T10 del material producido fue 242.1°C. Los métodos de tratamiento con hidrógeno, la isomerización, y otra modificación covalente de los aceites que se describen en la presente, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (como la filtración en frío) que se describen en la presente, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovables con otros valores de T10, tales como T10 entre 180 y 295, entre 190 y 270, entre 210 y 250, entre 225 y 245, y al menos 290.

50 La T90 del material producido fue 300°C. Los métodos de tratamiento con hidrógeno, la isomerización, y otra modificación covalente de los aceites que se describen en la presente, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (como la filtración en frío) que se describen en la presente, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovables con otros valores de T90, tales como T90 entre 280 y 380, entre 290 y 360, entre 300 y 350, entre 310 y 340, y al menos 290.

55 La FBP del material producido fue 300°C. Los métodos de tratamiento con hidrógeno, la isomerización, y otra modificación covalente de los aceites que se describen en la presente, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (como la filtración en frío) que se describen en la presente, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovables con otros valores FBP, tales como FBP entre 290 y 400, entre 300 y 385, entre 310 y 370, entre 315 y 360, y al menos 300.

60 Otros aceites proporcionados por los métodos y las composiciones de la invención se pueden someter a combinaciones de hidrotratamiento, isomerización, y otra modificación covalente, incluidos los aceites con perfiles de lípidos que incluyen (a) al menos 4% de C8-C14, (b) al menos 0,3% de C8, (c) al menos 2% de C10; (d) al menos 2% de C12 y (3) al menos 30% de C8-C14.

65 **EJEMPLO 14: Producción de aceites específicos**

Usando los método y materiales como se describen en la presente descripción, varios aceites específicos se produjeron. La Tabla 32 muestra la cepa, el gen y los números de acceso al Genbank de los genes que confieren el fenotipo y los perfiles de ácidos grasos diversos producidos por la cepa indicada. Las cepas A y B son ambas cepas de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), las dos se mutaron de la manera clásica para mejorar el rendimiento de aceite por un laboratorio que cobra honorarios por el servicio. Las cepas A y B se modificaron genéticamente después como se describe en la presente descripción con el constructo de ADN adecuado para expresar los genes deseados. Las cepas además se modificaron para inactivar las desaturasas endógenas, como se indicó. Las secuencias de nucleótidos de las tioesterasas eran codón optimizadas para la expresión y uso en *Prototheca*.

El perfil de ácido graso de la *Prototheca* silvestre, sin modificar se muestra en la primera línea de la Tabla 32. Como se puede observar, el perfil de ácido graso se alteró radicalmente en diferentes maneras en las diferentes cepas. Por ejemplo, el porcentaje de C8:0 producido por las células de *P. moriformis* sin modificar genéticamente es 0%. Sin embargo, las células de *P. moriformis* modificadas para expresar una tioesterasa de *C. hookeriana* aumentó la producción de C8:0 de 0% a 13.2 % del total de triglicéridos. Como otro ejemplo, la cantidad total combinada de C8:0 y C10:0 en las cepas modificadas fue aproximadamente 39% del total de ácidos grasos. En contraste, la cantidad total combinada de C8:0 y C10:0 en las células silvestres fue 0.01%. En otro ejemplo, la cantidad de ácidos grasos saturados aumentó de aproximadamente 32% a aproximadamente 90% por la expresión de una tioesterasa de *U. americana* en las células en que la expresión de SAD2b endógeno se interrumpió. Este es un aumento de casi 300%.

Los perfiles de ácidos grasos varios como se describen más abajo son útiles en una mirada de aplicaciones que implican a los aceites triglicéridos. Por ejemplo, altos niveles de ácidos grasos saturados de longitud de cadena de carbono inferior que comprenden los triglicéridos (C12:0, C14:0, C16:0) son particularmente útiles en la producción de combustible de reactor renovable. Para la producción de biodiesel, se desean grandes cantidades de C18:1. Para la producción de jabón de barra, se desea controlar y alcanzar el equilibrio adecuado entre los niveles de saturación y los ácidos grasos de cadena más corta. Como ejemplo, grandes cantidades de C12:0 son deseables para las propiedades espumantes mientras que las longitudes de cadenas más largas proporcionan más estructura, mientras que los triglicéridos que contengan linoléico y linolénico son menos deseables ya que ellos contribuyen a la inestabilidad oxidativa. Para los jabones líquidos, son deseables grandes cantidades de C12:0 y C14:0. Además, para la producción tanto de jabón de barra y de jabón líquido, son deseables cantidades bajas de C6:0, C8:0 y C10:0 ya que estos triglicéridos de cadenas más cortas son irritantes de la piel.

Tabla 32. Genes y números de acceso que confieren el fenotipo de perfiles de triglicérido diversos.

Rasgo	Acceso al Genbank y descripción	Gen que confiere el fenotipo	Constructo*	Sec. con núms. de ident. núm.	Fondo genético de la cepa	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	Saturados totales
silvestre			NA		UTEX 1435	0.00	0.01	0.04	1.27	27.20	3.85	58.70	7.18	32.36
C8 máximo	U39834	<i>C. hookeriana</i> TE	pSZ 1458		A	13.20	25.84	0.51	1.41	10.22	1.39	38.21	7.42	52.57
C10 máximo	U39834	<i>C. hookeriana</i> TE	pSZ 1458		A	13.20	25.84	0.51	1.41	10.22	1.39	38.21	7.42	52.57
C12 máximo	U56104 y U67317 (sec. con núm. de ident.: 185)	<i>C. wrightii</i> TE + <i>C. wrightii</i> KASA1	pSZ 1491 (sec. con núm. de ident.: 232)		B	.02	13.63	50.59	6.49	6.64	0.87	13.74	6.83	78.00
C14 máximo	U31813	<i>Cinnamomum camphora</i> TE	pSZ 941 (sec. con núm. de ident.: 236)/944 (sec. con núm. de ident.: 228)		UTEX 1435	0.00	0.06	5.91	43.27	19.63	0.87	13.96	13.78	69.74
C16 máximo	Q39513.1	<i>C. hookeriana</i> TE	pSZ 1417 (sec. con núm. de ident.: 226)		A	0.00	0.02	0.11	10.62	69.92	2.18	12.95	5.15	80.35
C18 máximo	U56104 como la interrupción del gen SAD2B	<i>C. wrightii</i> TE	pSZ 1410 (sec. con núm. de ident.: 230)		A	0.00	0.11	1.28	1.82	24.55	37.38	23.51	7.88	65.14
C8-C10 máximo	U39834	<i>C. hookeriana</i> TE	pSZ 1458		A	13.20	25.84	0.51	1.41	10.22	1.39	38.21	7.42	52.57
C8-C14 máximo	U56104	<i>C. wrightii</i> TE	pSZ 1283 (sec. con núm. de ident.: 229)		A	.22	17.64	45.85	10.94	5.55	0.79	13.49	4.68	74.65
C10-C14 máximo	U56104	<i>C. wrightii</i> TE	pSZ 1283 (sec. con núm. de ident.: 229)		A	.22	17.64	45.85	10.94	5.55	0.79	13.49	4.68	74.65
C12-C14 máximo	ABB71579.1 (sec. con núm. de ident.: 286)	<i>C. callophylla</i> TE	pSZ 1570 (sec. con núm. de ident.: 235)		B	.01	0.88	28.04	34.08	19.82	1.00	10.52	4.42	83.83
18:1 mínimo	AAB71731 (sec.	<i>Ulmus</i>	pSZ 1321 (sec.		A	.12	10.39	3.55	35.21	33.54	4.90	5.15	5.69	87.71



**Aceite de almendra de palma**

Se produjo un aceite de almendra de palma mimético microbiano que fue similar al aceite de almendra de palma (PKO). Para producir el aceite de almendra de palma mimético, se construyó un plásmido y se usó para transformar la cepa A y se llevó a cabo la producción de aceite. El constructo, pSZ1413 (sec. con núm. de ident.: 231), comprendía el gen optimizado por codón FATB2 (sec. con núm. de ident.: 284) (núm. de acceso al Genbank U56106) de *Cuphea wrightii* y el gen interrumpido SAD2B (estearoil ACP desaturasa).

Como se muestra en la Tabla 33 más abajo, el aceite de almendra de palma mimético fue similar al aceite de almendra de palma. Los porcentajes de los tres ácidos grasos más abundantes del mimético PKO (C12:0, C14:0 y C18:1) fueron idénticos o dentro del 10% del aceite de almendra de palma.

Tabla 33. Perfil de triglicéridos del aceite de almendra de palma mimético.

	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
<i>E. guineensis</i> (Almendra de palma) pSZ1413	3.0-5.0	2.5-6.0	40-52	14.0-18.0	7.0-10.0	1.0-3.0	11.0-19.0	0.5-4.0
		8.33	37.45	18.22	13.52	1.25	15.29	4.95

**Aceite de palma**

Se produjo un aceite de palma mimético microbiano que fue similar al aceite de palma. Algunos plásmidos diferentes se construyeron y transformaron individualmente en la cepa A y se llevó a cabo la producción de aceite. El constructo, pSZ1503 (sec. con núm. de ident.: 283), se diseñó para interrumpir un gen endógeno KASII. El constructo, pSZ1439 (sec. con núm. de ident.: 237), comprendía un gen TE optimizado por codón de *Elaeis guineensis* (sec. con núm. de ident.: 205) (núm. de acceso al Genbank AAD42220.2). El constructo, pSZ1420 (sec. con núm. de ident.: 225), comprendía un gen TE optimizado por codón de *Cuphea hookeriana* (sec. con núm. de ident.: 201) (núm. de acceso al Genbank Q39513). El constructo, pSZ1119 (sec. con núm. de ident.: 227), comprendía un gen KAS IV optimizado por codón de *Cuphea hookeriana* (sec. con núm. de ident.: 186) (núm. de acceso al Genbank AF060519) así como un gen FATB2 de *Cuphea wrightii* (sec. con núm. de ident.: 184) (núm. de acceso al Genbank U56104).

Como se muestra en la Tabla 34 más abajo, el aceite de palma mimético fue similar al aceite de palma. Los porcentajes de los tres ácidos grasos más abundantes del aceite de palma mimético (C16:0, C18:1 y C18:2) fueron idénticos o dentro del 10% del aceite de palma.

Tabla 34. Perfil de triglicérido de aceite de palma mimético.

	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
<i>E. guineensis</i> (Palma) pSZ1503	0	0	0.5-5.9	32.0-47.0	2.0-8.0	34-44	7.2-12.0
pSZ1439	0.01	0.01	0.83	38.36	2.21	48.31	7.60
pSZ1420	0.01	0.04	1.88	43.50	3.32	39.95	9.16
pSZ1119	0.02	0.04	2.44	48.04	2.76	35.62	8.91
	1.77	0.40	7.85	35.45	2.47	42.85	8.15

**Manteca de cacao**

Se produjo una manteca de cacao mimética microbiana que fue similar a la manteca de cacao. El constructo, pSZ1451, se construyó y se transformó en la cepa A y se llevó a cabo la producción de aceite. El constructo, pSZ1451 (sec. con núm. de ident.: 239), comprendía el gen TE optimizado por codón de *Carthamus tinctorius* (sec. con núm. de ident.: 187) (núm. de acceso al Genbank AAA33019.1).

Como se muestra en la Tabla 35 más abajo, el aceite de manteca de cacao mimético fue similar a la manteca de cacao. Los porcentajes de los tres ácidos grasos más abundantes de la manteca de cacao mimética (C16:0, C18:0 and C18:1) fueron idénticos o dentro del 10% de la manteca de cacao.

Tabla 35. Perfil de triglicérido de manteca de cacao mimética.

Manteca de cacao	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
pSZ1451	0	0-1	0-1	0-4	22-38	24-37	29-38	0-3
		0.05	0.14	0.99	28.34	27.39	29.40	10.26

**Lardo**

Se produjo un lardo mimético microbiano que fue similar al lardo. Algunos plásmidos diferentes se construyeron y transformaron individualmente en la cepa A y se llevó a cabo la producción de aceite. El constructo, pSZ1493 (sec. con núm. de ident.: 241), se diseñó para interrumpir el gen SAD 2B endógeno y expresar simultáneamente un gen TE optimizado por codón de *Umbellularia californica* (sec. con núm. de ident.: 285) (núm. de acceso al Genbank M94159). El constructo, pSZ1452 (sec. con núm. de ident.: 240), se diseñó para interrumpir el gen SAD 2B endógeno y expresar un gen TE optimizado por codón de *Garcinia mangostana* (sec. con núm. de ident.: 196) (núm. de acceso al Genbank AAB51525.1). El constructo, pSZ1449 (sec. con núm. de ident.: 238), se diseñó para expresar el gen TE optimizado por codón de *Brassica napus* (sec. con núm. de ident.: 195) (núm. de acceso al Genbank CAA52070.1). La secuencia de polinucleótido del constructo pSZ1458 fue idéntica a pSZ1449 excepto que una secuencia de polinucleótido optimizada por codón que codifica una tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (núm. de acceso al Genbank U39834) reemplazó la secuencia de nucleótido que codifica el gen TE de *Brassica napus* (sec. con núm. de ident.: 195) (núm. de acceso al Genbank CAA52070.1).

Como se muestra en la Tabla 36 más abajo, el lardo mimético fue similar al lardo. Los porcentajes de los tres ácidos grasos más abundantes del lardo mimético (C16:0, C18:0 and C18:1) fueron idénticos o dentro del 10% del lardo.

Tabla 36. Perfil de triglicérido de lardo mimético.

	<b>C14:0</b>	<b>C16:0</b>	<b>C18:0</b>	<b>C18:1</b>	<b>C18:2</b>
Lardo	3-4	22-26	13-18	39-45	8-15
pSZ1493	1.32	24.79	17.49	41.87	10.01
pSZ1452	1.16	24.49	17.94	45.49	8.05
pSZ1449	1.16	23.98	15.79	47.88	8.29

Las publicaciones mencionadas en la presente se citan con el propósito de describir y divulgar reactivos, metodologías y conceptos que se pueden usar en relación con la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un aceite de triglicéridos o un producto a base de aceite, el método comprendiendo:
- 5 a. cultivar una población de células de microalgas del género *Prototheca*, en un medio de cultivo hasta que por lo menos el 10% del peso de células seco de las células microbianas oleaginosas sea aceite de triglicéridos; y
- b. aislar la composición de aceite de triglicéridos de las células microbianas oleaginosas; en donde las células comprenden:
- 10 i) aceite de triglicéridos que tiene un perfil de ácidos grasos de por lo menos aproximadamente el 35% de ácidos grasos saturados; y
- ii) un gen KAS (ceto-acil ACP sintasa) exógeno, o un knockout de un gen KAS endógeno.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que las células comprenden aceite de triglicérido que tiene un perfil de ácidos grasos con menos del 7% de C18: 2.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que una desaturasa endógena de las células microbianas oleaginosas se ha inactivado o mutado para tener menos actividad enzimática.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que la desaturasa endógena es una estearoil ACP desaturasa.
5. El método de la reivindicación 3, en el que la desaturasa endógena es una desaturasa de ácido graso delta 12.
- 25 6. El método de la reivindicación 4 o 5, en el que la desaturasa se ha inactivado mediante la introducción de un gen exógeno en su locus.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que las células expresan un gen de acil-ACP tioesterasa grasa exógeno y/o un gen de invertasa de sacarosa.
- 30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la célula es de la especie *Prototheca moriformis*.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el aceite de triglicéridos o producto a base de aceite tiene un perfil de ácidos grasos de por lo menos aproximadamente el 50% de ácidos grasos saturados.
- 35 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el perfil de ácidos grasos del aceite de triglicéridos es similar al perfil de aceite de triglicéridos de un aceite de origen natural.
- 40 11. El método de la reivindicación 10, en el que el aceite de origen natural se selecciona del grupo que consiste de manteca de cacao, aceite de coco, aceite de palma, aceite de almendra de palma, manteca de karité, sebo de buey y lardo.
- 45 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho aceite de origen natural es aceite de palma y en el que dicho gen exógeno comprende, una combinación de un gen KAS IV de *Cuphea hookeriana* y un gen FATB2 de *Cuphea wrightii*, o un constructo diseñado para alterar un gen KAS II endógeno.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende además producir un producto a base de aceite a partir del aceite.
- 50 14. El método de la reivindicación 13, en el que el producto a base de aceite se produce sometiendo el aceite de triglicéridos microbiano oleaginoso a por lo menos una reacción química seleccionada del grupo que consiste de: saponificación; metátesis; hidrólisis ácida; hidrólisis alcalina; hidrólisis enzimática; hidrólisis catalítica; hidrólisis de agua comprimida en caliente; una reacción de hidrólisis catalítica en la que el lípido se divide en glicerol y ácidos grasos; una reacción de aminación para producir compuestos de nitrógeno graso; una reacción de ozonólisis para producir ácidos mono- y dibásicos; una reacción de división de triglicéridos seleccionada del grupo que consiste de división enzimática y división por presión; una reacción de condensación que sigue a una reacción de hidrólisis; una reacción de hidroprocesamiento; una reacción de hidroprocesamiento y una reacción de desoxigenación o una reacción de condensación antes o simultáneamente con la reacción de hidroprocesamiento; una reacción de eliminación de gas; una reacción de desoxigenación seleccionada del grupo que consiste de una reacción de hidrogenólisis, hidrogenación, una reacción de hidrogenación-hidrogenólisis consecutiva, una reacción de hidrogenólisis-hidrogenación consecutiva; y una reacción de hidrogenación-hidrogenólisis combinada; una reacción de condensación después de una reacción de desoxigenación; una reacción de esterificación; una reacción de interesificación; una reacción de transesterificación; una reacción de hidroxilación; y una reacción de condensación después de una reacción de hidroxilación.
- 60
- 65

15. El método de la reivindicación 14, en el que el producto a base de aceite se selecciona del grupo que consiste de jabón, combustible, fluido dieléctrico, fluido hidráulico, plastificante, lubricante, fluido de transferencia de calor, y fluido para el trabajo de metales.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Archivo de Datos :5111109\01\F2001.D

Figura 1

