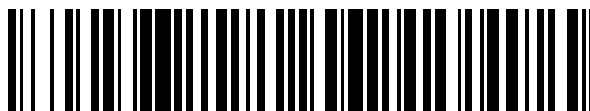


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 493**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2010** **PCT/US2010/049347**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011** **WO11035166**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2010** **E 10817922 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 2478089**

54 Título: **Fermentación de microalgas usando iluminación controlada**

30 Prioridad:

29.06.2010 US 359726 P

18.09.2009 US 243593 P

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

22.11.2019

73 Titular/es:

**PHYCOIL BIOTECHNOLOGY INTERNATIONAL,
INC. (100.0%)**

**1600 Adams Drive Suite 103
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**IM, CHUNG-SOON y
KIM, JANE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 732 493 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fermentación de microalgas usando iluminación controlada

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/243.593, presentada el 18 de septiembre de 2009 y la solicitud provisional estadounidense n.º 61/359.726, presentada el 29 de junio de 2010.

Campo

La invención se refiere a métodos, medios y sistemas de fermentación de microorganismos, por ejemplo, microalgas. La invención puede usarse en industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias, así como para obtener petróleo y biocombustible a partir de microalgas.

Antecedentes

Recientemente, se ha prestado atención a la aplicación de microalgas para la producción de una variedad de materiales incluyendo lípidos, hidrocarburos, petróleo, polisacáridos, pigmentos y biocombustibles.

Uno de los métodos convencionales para hacer crecer microalgas es cultivarlas de manera heterótrofa en un sistema cerrado, sin luz. Se han desarrollado técnicas para la producción a gran escala de microalgas acuáticas en condiciones de crecimiento heterótrofo utilizando carbono orgánico en lugar de luz como fuente de energía. Por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 3.142.135 y 3.882.635 describen procedimientos para la producción heterótrofa de proteínas y pigmentos a partir de algas tales como *Chlorella*, *Spongiococcum* y *Prototheca*. Además, los cultivos de algas heterótrofas pueden conservar densidades mucho mayores que los cultivos fotoautótrofos.

Sin embargo, la aplicación anterior no puede aplicarse a todas las microalgas ya que sólo un número limitado de cepas de microalgas puede crecer en condiciones heterótrofas. Los intentos por hacer crecer microalgas en condiciones heterótrofas implican a menudo o bien detección de cepas que pueden crecer en condiciones heterótrofas o bien modificación genética de organismos para permitir el crecimiento en tales condiciones.

Las microalgas que contienen tanto un sistema de transporte adecuado para el azúcar como que pueden crecer de manera natural en condiciones heterótrofas a menudo muestran tasas de crecimiento bajas o producción de materiales baja de interés comercial puesto que han evolucionado muchos años para utilizar la luz solar como señal ambiental para controlar aspectos del metabolismo así como energía generada a través de la fotosíntesis.

La mayoría de los organismos fotosintéticos, incluyendo las microalgas, usan la luz como señal ambiental para optimizarse para el crecimiento y la supervivencia. Las señales luminosas son detectadas por diferentes fotorreceptores incluyendo fotorreceptores de luz roja/roja lejana (fitocromos) y fotorreceptor de luz azul (criptocromos y NPH). La luz actúa como señal ambiental que regula los procesos fisiológicos y de desarrollo y proporciona la energía que alimenta la reducción de carbono inorgánico. Sin embargo, en determinadas condiciones la luz también tiene el potencial de ser tóxica. La fotoinhibición se produce o bien cuando el flujo de fotones absorbido por los cloroplastos es muy alto (en condiciones de mucha luz) o cuando el flujo de entrada de energía lumínica supera la capacidad de consumo (en condiciones mixótrofas en las que una célula usa carbono reducido como fuente de energía). En condiciones mixótrofas, los organismos fotosintéticos muestran fotoinhibición a una intensidad de luz mucho menor que en condiciones autótrofas puesto que los electrones absorbidos a través del aparato fotosintético no pueden usarse de manera eficaz debido a un mecanismo de retroalimentación en el ciclo de Calvin.

La energía lumínica absorbida puede dar como resultado la acumulación de moléculas de clorofila excitadas dentro del lecho del pigmento y el daño del fotosistema. Las moléculas de clorofila excitadas que se acumulan en el lecho del pigmento como consecuencia de excitación excesiva también pueden estimular la producción de especies de oxígeno activas tales como superóxidos, radicales de hidroxilo y oxígeno singlete.

Wei, Xiong *et al.* (2007) dan a conocer la fermentación de *Chlorella protothecoides* en un biorreactor en condiciones heterótrofas que incluyen glucosa 15-60 g/l como fuente de carbono e irradiación lumínica débil a 5 micromol de fotones $m^{-2}s^{-1}$. Day, John *et al.* (1996) dan a conocer el cultivo de *Tetraselmis* en condiciones mixótrofas (fotoheterótrofas) en un fermentador en un medio que contiene glucosa 40 g/l bajo irradiación lumínica a 10 micromol de fotones $m^{-2}s^{-1}$. Luisa Gouveia *et al.* (2009) se refieren a la cepa de *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185 cultivada en biorreactores de columna de burbujas de vidrio de 1 l usando CO₂ como fuente de carbono y bajo iluminación continua a un nivel de irradiancia de 150 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$. El documento US2009/211150 se refiere a métodos de producción de biodiésel usando *Chlorella protothecoids*.

Sumario

En el presente documento se da a conocer un método para cultivar una microalga capaz de crecimiento heterótrofo, que incluye: incubar la microalga en una condición de crecimiento heterótrofo durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que crezca la microalga, en el que la microalga es una cepa de *Botryococcus*, una cepa de

Neochloris o una cepa de *Chlamydomonas*, en el que la condición de crecimiento heterótrofo comprende un medio que comprende una fuente de carbono fija, y en el que la condición de crecimiento heterótrofo comprende además una irradiancia de una luz blanca de 3-4 μmol de fotones/ m^2s , luz azul de 2-3 μmol de fotones/ m^2s y/o luz roja de 1-2 μmol de fotones/ m^2s .

- 5 En algunas realizaciones, la microalga es una cepa de *Botryococcus sudeticus*. En algunas realizaciones, la microalga es una cepa UTEX 2629. En algunas realizaciones, la microalga es una cepa de *Botryococcus braunii*. En algunas realizaciones, la microalga es una cepa UTEX 2441. En algunas realizaciones, la microalga es una cepa de *Neochloris oleabundans*. En algunas realizaciones, la microalga es una cepa UTEX 1185. En algunas realizaciones, la microalga es una cepa de *Chlamydomonas reinhardtii*. En algunas realizaciones, la microalga es una cepa UTEX 2243. En algunas realizaciones, la microalga comprende un fotorreceptor.

En algunas realizaciones, la fuente de carbono es glucosa. En algunas realizaciones, la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en una fuente de carbono fija, glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, xilosa, manosa, ramnosa, N-acetilglucosamina, glicerol, floridósido, ácido glucurónico, almidón de maíz, material celulósico despolimerizado, caña de azúcar, remolacha azucarera, lactosa, suero de leche y melaza.

- 15 En algunas realizaciones, la luz se produce mediante una fuente de luz natural. En algunas realizaciones, la luz es luz solar natural. En algunas realizaciones, la luz comprende luz de espectro completo o una longitud de onda de luz específica. En algunas realizaciones, la luz se produce mediante una fuente de luz artificial. En algunas realizaciones, la luz es luz artificial.

- 20 En algunas realizaciones, el método incluye además producir un material a partir de la microalga. En algunas realizaciones, el material es un polisacárido, un pigmento, un lípido o un hidrocarburo. En algunas realizaciones, el material es un hidrocarburo.

En algunas realizaciones, el método incluye además recuperar el material. En algunas realizaciones, el método incluye además extraer el material.

- 25 En algunas realizaciones, el método incluye además procesar el material. En algunas realizaciones, el procesamiento del material produce un material procesado. En algunas realizaciones, el material procesado se selecciona del grupo que consiste en un combustible, biodiésel, carborreactor, un cosmético, un agente farmacéutico, un tensioactivo y un diésel renovable.

- 30 En algunas realizaciones, la tasa de crecimiento de las microalgas en los métodos anteriores es mayor que una segunda microalga incubada en una segunda condición de crecimiento heterótrofo durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que crezca la microalga, en el que la segunda condición de crecimiento heterótrofo incluye un medio de crecimiento que comprende una fuente de carbono, y en el que la segunda condición de crecimiento heterótrofo no incluye una baja irradiancia de luz.

- 35 En el presente documento también se describe un método de fabricación de un material, que incluye: proporcionar una microalga capaz de producir el material, en el que la microalga es una cepa de *Botryococcus*, una cepa de *Neochloris* o una cepa de *Chlamydomonas*; cultivar la microalga en un medio en una condición de crecimiento heterótrofo durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que crezca la microalga, en el que el medio incluye una fuente de carbono fija; aplicar una irradiancia de una luz blanca de 3-4 μmol de fotones/ m^2s , luz azul de 2-3 μmol de fotones/ m^2s y/o luz roja de 1-2 μmol de fotones/ m^2s a la microalga; y permitir que la microalga acumule al menos el 10% de su peso celular seco como material. En algunas realizaciones, el método incluye además recuperar el material.

- 40 En el presente documento también se describe un sistema de biorreactor, que incluye: un biorreactor; un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono fija, en el que el medio de cultivo se sitúa dentro del biorreactor; una microalga adaptada para crecimiento heterótrofo, en el que la microalga se sitúa en los medios de cultivo y es una cepa de *Botryococcus*, una cepa de *Neochloris* o una cepa de *Chlamydomonas*; y una fuente de luz, en el que la fuente de luz produce una irradiancia de una luz blanca de 3-4 μmol de fotones/ m^2s , luz azul de 2-3 μmol de fotones/ m^2s y/o luz roja de 1-2 μmol de fotones/ m^2s , y en el que la fuente de luz se acopla operativamente al biorreactor.

- 45 En algunas realizaciones, la luz de la fuente de luz incluye luz solar natural recogida por un colector de energía solar acoplado operativamente al biorreactor, y en el que la luz se transmite al interior del biorreactor a través de una fibra óptica acoplada operativamente al colector solar y al biorreactor. En algunas realizaciones, la luz de la fuente de luz incluye luz artificial, en la que la luz artificial se produce mediante un diodo emitido por luz (LED) o una luz fluorescente. En algunas realizaciones, el sistema incluye además una fuente de energía suficiente para alimentar el LED o luz fluorescente, en el que la fuente de energía se acopla operativamente al biorreactor; y un controlador de luz unido operativamente a la fuente de energía, en el que el controlador de luz está adaptado para controlar la intensidad y longitud de onda de luz emitida por el LED o luz fluorescente. En algunas realizaciones, la fibra óptica se monta en una estructura de luz transparente y protectora. En algunas realizaciones, el LED se monta en una estructura de luz transparente y protectora.

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, y dibujos adjuntos, en donde:

La figura 1 es una realización de un biorreactor.

5 La figura 2 ilustra la ruta isoprenoide/carotenoide.

Las figuras 3A-C muestran el crecimiento de UTEX 1185 en condiciones de luz blanca, azul y roja. El eje X se muestra en días. Glu significa glucosa.

Las figuras 4A-C muestran el crecimiento de UTEX 2629 en condiciones de luz blanca, azul y roja. El eje X se muestra en días. Glu significa glucosa.

10 Las figuras 5A-C muestran el crecimiento de UTEX 2441 en condiciones de luz blanca, azul y roja. Glu significa glucosa.

La figura 6 muestra la producción de lípidos por UTEX 2441 en condiciones de luz roja. LG significa luz + glucosa; DG significa oscuridad + glucosa.

La figura 7 muestra el crecimiento de UTEX 2243 en condiciones de luz blanca.

15 **Descripción detallada**

Los términos usados en las reivindicaciones y memoria descriptiva se definen tal como se establece a continuación a menos que se especifique lo contrario.

“Axénico” significa un cultivo de un organismo que está libre de contaminación por otros organismos vivos.

20 “Biodiésel” es un éster alquílico de ácido graso producido biológicamente adecuado para su uso como combustible en un motor diésel.

El término “biomasa” se refiere a material producido por crecimiento y/o propagación de células. Biomasa puede contener células y/o contenidos intracelulares así como material extracelular. El material extracelular incluye, pero no se limita a, compuestos secretados por una célula.

25 “Biorreactor” significa un recinto o recinto parcial en el que las células se cultivan, opcionalmente en suspensión. La figura 1 es un ejemplo de un biorreactor. “Fotobiorreactor” se refiere a un recipiente, al menos parte del cual es al menos parcialmente transparente o parcialmente abierto, permitiendo de ese modo que pase luz a través, en el cual se cultivan una o más células de microalgas. Los fotobiorreactores pueden estar cerrados, como en el caso de una bolsa de polietileno o matraz de Erlenmeyer, o pueden estar abiertos al medio ambiente, como en el caso de un estanque al aire libre.

30 Tal como se usa en el presente documento, un “catalizador” se refiere a un agente, tal como una molécula o complejo macromolecular, capaz de facilitar o promover una reacción química de un reactivo con un producto sin volverse parte del producto. Por tanto, un catalizador aumenta la velocidad de una reacción, tras lo cual, el catalizador puede actuar sobre otro reactivo para formar el producto. Un catalizador reduce generalmente la energía de activación global requerida para la reacción de modo que avanza más rápidamente o a una temperatura inferior. Por tanto, el equilibrio de la reacción puede lograrse más rápidamente. Los ejemplos de catalizadores incluyen 35 enzimas, que son catalizadores biológicos, calor, que es un catalizador no biológico, y catalizadores metálicos usados en procesos de refinación de petróleo fósil.

40 “Material celulósico” se refiere a los productos de digestión de celulosa, incluyendo glucosa y xilosa, y opcionalmente compuestos adicionales tales como disacáridos, oligosacáridos, lignina, furfurales y otros compuestos. Los ejemplos no limitativos de fuentes de material celulósico incluyen bagazos de caña de azúcar, pulpa de remolacha azucarera, rastrojo de maíz, virutas de madera, serrín y pasto varilla.

45 El término “cocultivo”, y variantes del mismo tales como “cocultivar”, 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, tales como microalgas, o pueden ser una célula de microalga cultivada con un tipo de célula diferente. Las condiciones de cultivo pueden ser aquellas que fomentan el crecimiento y/o la propagación de los dos o más tipos de células o aquellas que facilitan el crecimiento y/o la proliferación de una, o un subconjunto, de las dos o más células mientras se mantiene el crecimiento celular para el resto.

El término “cofactor” se usa en el presente documento para referirse a cualquier molécula, distinta del sustrato, que se requiere para que una enzima lleve a cabo su actividad enzimática.

50 El término “cultivado”, y variantes del mismo, se refieren al fomento intencional del crecimiento (aumentos en el

- tamaño celular, contenido celular y/o actividad celular) y/o la propagación (aumento en los números celulares por medio de mitosis) de una o más células mediante el uso de condiciones de cultivo previstas. La combinación de tanto crecimiento como propagación puede denominarse proliferación. La una o más células pueden ser aquellas de un microorganismo, tal como microalgas. Los ejemplos de condiciones previstas incluyen el uso de un medio definido (con características conocidas tales como pH, fuerza iónica y fuente de carbono), temperatura especificada, tensión de oxígeno, niveles de dióxido de carbono y crecimiento en un biorreactor. El término no se refiere al crecimiento o la propagación de microorganismos en la naturaleza o de otro modo sin intervención humana directa, tal como crecimiento natural de un organismo que finalmente se fosiliza para producir petróleo crudo geológico.
- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “citólisis” se refiere a la lisis de células en un ambiente hipotónico. La citólisis está provocada por ósmosis excesiva, o movimiento de agua, hacia el interior de una célula (hiperhidratación). La célula no puede soportar la presión osmótica del agua en el interior, y por tanto explota.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, los términos “vector de expresión” o “constructo de expresión” se refieren a un constructo de ácido nucleico, generado de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o fragmento de ácido nucleico. Normalmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que va a transcribirse operativamente unido a un promotor.
- 15 “Gen exógeno” se refiere a un ácido nucleico transformado en una célula. Una célula transformada puede denominarse célula recombinante, en la que puede(n) introducirse gen(es) exógeno(s) adicional(es). El gen exógeno puede ser de una especie diferente (y por tanto heteróloga), o de la misma especie (y por tanto homóloga) en relación con la célula que está transformándose. En el caso de un gen homólogo, ocupa una ubicación diferente en el genoma de la célula en relación con la copia endógena del gen. El gen exógeno puede estar presente en más de una copia en la célula. El gen exógeno puede mantenerse en una célula como inserción en el genoma o como molécula episomal.
- 20 “Proporcionado de manera exógena” describe una molécula proporcionada a los medios de cultivo de un cultivo celular.
- 25 “Fuente de carbono fija” significa molécula(s) que contiene(n) carbono, por ejemplo orgánico, que están presentes a temperatura y presión ambiental en forma sólida o líquida.
- “Homogeneizado” significa biomasa que se ha alterado físicamente.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, “hidrocarburo” se refiere a: (a) una molécula que contiene sólo átomos de hidrógeno y carbono en la que los átomos de carbono se unen de manera covalente formando una estructura principal lineal, ramificada, cíclica o parcialmente cíclica a la que se unen los átomos de hidrógeno; o (b) una molécula que sólo contiene principalmente átomos de hidrógeno y carbono y que puede convertirse para que contenga sólo átomos de hidrógeno y carbono mediante de una a cuatro reacciones químicas. Los ejemplos no limitativos del último incluyen hidrocarburos que contienen un átomo de oxígeno entre un átomo de carbono y uno de hidrógeno para formar una molécula de alcohol, así como aldehídos que contienen un único átomo de oxígeno. Los métodos para la reducción de alcoholes a hidrocarburos que contienen sólo átomos de carbono e hidrógeno se conocen bien. Otro ejemplo de un hidrocarburo es un éster, en el que un grupo orgánico reemplaza un átomo de hidrógeno (o más de uno) en un ácido de oxígeno. La estructura molecular de compuestos de hidrocarburo varía entre la más simple, en forma de metano (CH_4), que es un constituyente de gas natural, a la muy pesada y muy compleja, tal como algunas moléculas tales como asfaltenos encontrados en petróleo crudo, petróleo y bitúmenes. Los hidrocarburos pueden estar en forma gaseosa, líquida o sólida, o cualquier combinación de estas formas, y pueden tener uno o más dobles o triples enlaces entre átomos de carbono adyacentes en la estructura principal. Por consiguiente, el término incluye alcanos lineales, ramificados, cíclicos o parcialmente cíclicos, alquenos, lípidos y parafina. Los ejemplos incluyen propano, butano, pentano, hexano, octano, trioleína y escualeno.
- 35 El término “razón de hidrógeno:carbono” se refiere a la razón de átomos de hidrógeno con respecto a átomos de carbono en una molécula en una base de átomo a átomo. La razón puede usarse para referirse al número de átomos de carbono e hidrógeno en una molécula de hidrocarburo. Por ejemplo, el hidrocarburo con la mayor razón es metano CH_4 (4:1).
- 40 “Fracción hidrófoba” se refiere a la porción, o fracción, de un material que es más soluble en una fase hidrófoba en comparación con una fase acuosa. Una fracción hidrófoba es sustancialmente insoluble en agua y habitualmente apolar.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “aumentar el rendimiento lipídico” se refiere a un aumento en la productividad de un cultivo microbiano, por ejemplo, aumentando el peso seco de células por litro de cultivo, aumentando el porcentaje de células que constituyen lípidos, o aumentando la cantidad global de lípidos por litro de volumen de cultivo por unidad de tiempo.
- 50 Un “promotor inducible” es uno que media la transcripción de un gen unido operativamente en respuesta a un

estímulo particular.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “en unión operable” se refiere a una unión funcional entre dos secuencias, tal como una secuencia de control (normalmente un promotor) y la secuencia unida. Un promotor está en unión operable con un gen exógeno si puede mediar en la transcripción del gen.

5 El término “*in situ*” significa “en su sitio” o “en su posición original”. Por ejemplo, un cultivo puede contener una primera microalga que secreta un catalizador y un segundo microorganismo que secreta un sustrato, en el que los tipos de células primero y segundo producen los componentes necesarios para que una reacción química particular se produzca *in situ* en el cocultivo sin requerir separación o procesamiento adicionales de los materiales.

10 Una “concentración limitativa de un nutriente” es una concentración en un cultivo que limita la propagación de un organismo cultivado. Una “concentración no limitativa de un nutriente” es una concentración que soporta la propagación máxima durante un periodo de cultivo dado. Por tanto, el número de células producidas durante un periodo de cultivo dado es menor en presencia de una concentración limitativa de un nutriente que cuando el nutriente no es limitativo. Se dice que un nutriente está “en exceso” en un cultivo, cuando el nutriente está presente a una concentración mayor que la que soporta la propagación máxima.

15 Tal como se usa en el presente documento, una “lipasa” es una enzima soluble en agua que cataliza la hidrólisis de enlaces de éster en sustratos lipídicos insolubles en agua. Las lipasas catalizan la hidrólisis de lípidos en glicerol y ácidos grasos.

20 Los “lípidos” son una clase de hidrocarburos que son solubles en disolventes apolares (tales como éter y cloroformo) y son relativa o completamente insolubles en agua. Las moléculas lipídicas tienen estas propiedades porque consisten en gran medida en colas largas de hidrocarburos que son de naturaleza hidrófoba. Los ejemplos de lípidos incluyen ácidos grasos (saturados e insaturados); glicéridos o glicerolípido (tales como monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos o grasas neutras, y fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos); no glicéridos (esfingolípidos, lípidos de esteroides incluyendo colesterol y hormonas esteroideas, lípidos de prenoles incluyendo terpenoides, alcoholes grasos, ceras y policétidos); y derivados lipídicos complejos (lípidos unidos a azúcar, o glicolípidos y lípidos unidos a proteína). Las “grasas” son un subgrupo de lípidos denominado “triacilglicéridos.”

El término “baja irradiancia de luz” se refiere a la irradiancia de luz que puede aplicarse a un microorganismo mientras se evita fotoinhibición significativa en condiciones heterótrofas y la irradiancia de luz necesaria para iniciar un metabolismo activado por luz en el microorganismo. Los metabolismos activados por luz incluyen, pero no se limitan a, un ciclo vital, un ritmo circadiano, división celular, una ruta biosintética y un sistema de transporte.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “lisado” se refiere a una disolución que contiene el contenido de células lisadas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “lisis” se refiere a la ruptura de la membrana plasmática y opcionalmente la pared celular de un organismo biológico suficiente para liberar al menos algo de contenido intracelular, a menudo mediante mecanismos mecánicos, virales u osmóticos que comprometen su integridad.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “lisar” se refiere a alterar la membrana celular y opcionalmente la pared celular de un organismo biológico o célula suficiente para liberar al menos algo de contenido intracelular.

40 “Microalga” significa un organismo microbiano eucariota que contiene un cloroplasto, y que es capaz opcionalmente de realizar fotosíntesis, o un organismo microbiano procariota capaz de realizar fotosíntesis. Las microalgas incluyen fotoautótrofos obligados, que no pueden metabolizar una fuente de carbono fija como energía, así como heterótrofos, que pueden vivir exclusivamente de una fuente de carbono fija. Microalgas puede referirse a organismos unicelulares que se separan de células hermanas poco después de la división celular, tal como *Chlamydomonas*, y también puede referirse a microbios tales como, por ejemplo, *Volvox*, que es un microbio fotosintético multicelular simple de dos tipos celulares distintos. “Microalgas” también puede referirse a células tales como *Chlorella* y *Dunaliella*. Las “microalgas” también incluyen otros organismos fotosintéticos microbianos que presentan adhesión entre células, tal como *Agmenellum*, *Anabaena* y *Pyrobotrys*. Las “microalgas” también incluyen microorganismos heterótrofos obligados que han perdido la capacidad de realizar fotosíntesis, tales como determinadas especies de algas dinoflageladas. A continuación se describen otros ejemplos de microalgas.

50 Los términos “microorganismo” y “microbio” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a organismos unicelulares microscópicos, por ejemplo, microalgas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “choque osmótico” se refiere a la ruptura de células en una disolución tras la reducción repentina de la presión osmótica. A veces se induce choque osmótico para liberar componentes celulares de tales células en una disolución.

55 “Polisacáridos” (también denominados “glicanos”) son hidratos de carbono formados por monosacáridos unidos juntos mediante enlaces glicosídicos. La celulosa es un ejemplo de un polisacárido que constituye determinadas

paredes celulares vegetales. La celulosa puede despolimerizarse mediante enzimas para dar monosacáridos tales como xilosa y glucosa, así como disacáridos y oligosacáridos mayores.

“Puerto”, en el contexto de un biorreactor, se refiere a una abertura en el biorreactor que permite la entrada o salida de materiales tales como gases, líquidos y células. Los puertos están conectados habitualmente a la tubería que sale del biorreactor.

Un “promotor” se define como una serie de secuencias de control de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se usa en el presente documento, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos supresores o potenciadores distales, que pueden ubicarse a varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción.

Tal como se usa en el presente documento, el término “recombinante” cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de una proteína o ácido nucleico exógeno o la alteración de una proteína o ácido nucleico nativo, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan de otro modo de manera anómala, subexpresados o no expresados en absoluto. Mediante el término “ácido nucleico recombinante” quiere decirse en el presente documento ácido nucleico, formado originalmente *in vitro*, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza. De esta manera, se logra unión operativa de diferentes secuencias. Por tanto, un ácido nucleico aislado, en forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* ligando moléculas de ADN que no se unen normalmente, se consideran ambos recombinantes para los fines de esta invención. Se entiende que una vez se produce un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula u organismo huésped, se replicará de manera no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos de manera recombinante, aunque se replican posteriormente de manera no recombinante, aún se consideran recombinantes para los fines de la invención. De manera similar, una “proteína recombinante” es una proteína producida usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante tal como se representa anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “diésel renovable” se refiere a alcanos (tal como C:10:0, C12:0, C:14:0, C16:0 y C18:0) producidos a través de hidrogenación y desoxigenación de lípidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sonicación” se refiere a un proceso de alteración de materiales biológicos, tales como una célula, mediante el uso de energía de ondas sonoras.

“Especies de furfural” se refiere a 2-furancarboxaldehído o un derivado del mismo que conserva las mismas características estructurales básicas.

Tal como se usa en el presente documento, “rastroy” se refiere a las hojas y tallos secos de un cultivo que permanecen después de que se haya cosechado el grano.

“Agua residual” es residuo acuoso que contiene normalmente agua de lavado, residuos de lavandería, heces, orina y otros residuos líquidos o semilíquidos. Incluye algunas formas de residuos municipales así como aguas negras tratadas de manera secundaria.

Debe indicarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Microorganismos

Puede usarse cualquier especie de organismo que produce lípidos o hidrocarburos adecuados, aunque se prefieren microorganismos que producen de manera natural altos niveles de lípidos o hidrocarburos adecuados. La producción de hidrocarburos por microorganismos la revisan Metzger *et al.* Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66: 486-496 y A Look Back at the U.S. Department of Energy’s Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann y Paul Roessler (1998).

Las consideraciones que afectan la selección de microorganismos para su uso en la invención incluyen, además de producción de lípidos o hidrocarburos adecuados para la producción de aceites, combustibles y oleoquímicos, incluyen: (1) alto contenido en lípidos como porcentaje de peso celular; (2) facilidad de crecimiento; (3) facilidad de modificación por ingeniería genética; y (4) facilidad de procesamiento de biomasa. En realizaciones particulares, el microorganismo silvestre o modificado por ingeniería genética produce células que son al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, o al menos el 70% o más de lípidos. Los organismos preferidos crecen de manera heterótrofa o pueden modificarse por ingeniería genética para que lo hagan usando, por ejemplo, métodos dados a conocer en el presente documento. La facilidad de transformación y disponibilidad de promotores y marcadores seleccionables, constitutivos y/o inducibles, que son funcionales en el

microorganismo afectan a la facilidad de modificación por ingeniería genética. Las consideraciones de procesamiento pueden incluir, por ejemplo, la disponibilidad de medios eficaces para lisar las células.

En una realización, los microorganismos incluyen microorganismos naturales o modificados por ingeniería genética que pueden crecer en una condición heterótrofa y usan luz como señal para controlar los procesos celulares. Estos pueden incluir un alga tal como Cyanophyta, Chlorophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Chlorarachniophyta, Haptophyta, Euglenophyta, Heterokontophyta y Diatomea.

Algas

En una realización de la presente invención, el microorganismo es una microalga. A continuación se describen ejemplos no limitativos de microalgas que pueden usarse según la presente invención.

- 10 Más específicamente, los taxones de algas que pertenecen a Cyanophyta, incluyendo Cyanophyceae, son aquellos que son Prokaryotae, que tienen la capacidad de fotosíntesis de tipo evolución de oxígeno y se clasifican en los siguientes órdenes y familias. Chroococcales incluye Microcystaceae, Chroococcaceae, Entophysalidaceae, Chamaesiphoniaceae, Dermocarpellaceae, Xenococcaceae e Hydrococcaceae, Oscillatoriales incluye Borziaceae, Pseudanabaenaceae, Schizotrichaceae, Phormidiaceae, Oscillatoriaceae y Homoeotrichaceae, Nostocales incluye Scytonemataceae, Microchaetaceae, Rivulariaceae y Nostocaceae y Stigonematales incluye Chlorogloeopsaceae, Capsosiraceae, Stigonemataceae, Fischerellaceae Borzinemataceae, Nostochopsaceae y Mastigocladaceae.

- Chlorophyta incluye Chlorophyceae, Prasinophyceae, Pedinophyceae, Trebouxiophyceae y Ulvophyceae. Más específicamente, Chlorophyceae incluye *Acetabularia*, *Acicularia*, *Actinochloris*, *Amphikrikos*, *Anadyomene*, *Ankistrodesmus*, *Ankyra*, *Aphanochaete*, *Ascochloris*, *Asterococcus*, *Asteromonas*, *Astrephomene*, *Atractomorpha*, *Axilococcus*, *Axilosphaera*, *Basichlamys*, *Basicladia*, *Binuclearia*, *Bipedinomonas*, *Blastophysa*, *Boergesenia*, *Boodlea*, *Borodinella*, *Borodinellopsis*, *Botryococcus*, *Brachiomonas*, *Bracteacoccus*, *Bulbochaete*, *Caespitella*, *Capsosiphon*, *Carteria*, *Centrosphaera*, *Chaetomorpha*, *Chaetonema*, *Chaetopeltis*, *Chaetophora*, *Chalmasia*, *Chamaetrichon*, *Characiocloris*, *Characiosiphon*, *Characium*, *Chlamydeella*, *Chlamydobotrys*, *Chlamydocapsa*, *Chlamydomonas*, *Chlamydropodium*, *Cloranomala*, *Chlorochoydrion*, *Chlorochoytrium*, *Chlorocladus*, *Chlorocloster*, *Chlorococcopsis*, *Chlorococcum*, *Chlorogonium*, *Chloromonas*, *Chlorophysalis*, *Chlorosarcina*, *Chlorosarcinopsis*, *Chlorosphaera*, *Chlorosphaeropsis*, *Chlorotetraedron*, *Chlorothecium*, *Chodatella*, *Choricystis*, *Cladophora*, *Cladophoropsis*, *Cloniophora*, *Closteriopsis*, *Cocobotrys*, *Coelastrella*, *Coelastropsis*, *Coelastrum*, *Coenocloris*, *Coleochlamys*, *Coronastrum*, *Crucigenia*, *Crucigeniella*, *Ctenocladus*, *Cylindrocapsa*, *Cylindrocapsopsis*, *Cylindrocystis*, *Cymopolia*, *Cystococcus*, *Cystomonas*, *Dactilococcus*, *Dasycladus*, *Deasonia*, *Derbesia*, *Desmatractum*, *Desmodesmus*, *Desmotetra*, *Diacanthos*, *Dicellula*, *Dicloster*, *Dicranochaete*, *Dictyocloris*, *Dictyococcus*, *Dictyosphaeria*, *Dictyosphaerium*, *Didymocystis*, *Didymogenes*, *Dilabifilum*, *Dimorphococcus*, *Diplosphaera*, *Draparnaldia*, *Dunaliella*, *Dysmorphococcus*, *Echinocoleum*, *Elakathrix*, *Enallax*, *Entocladia*, *Entransia*, *Eremosphaera*, *Ettlia*, *Eudorina*, *Fasciculocloris*, *Fernandinella*, *Follicularia*, *Fottea*, *Franceia*, *Friedmannia*, *Fritschella*, *Fusola*, *Geminella*, *Gloeococcus*, *Gloeocystis*, *Gloeodendron*, *Gloeomonas*, *Gloeotila*, *Golenkinia*, *Gongrosira*, *Gonium*, *Graesiella*, *Granulocystis*, *Gyrorfiana*, *Haematococcus*, *Hazenella*, *Helicodictyon*, *Hemicloris*, *Heterochlamydomonas*, *Heteromastix*, *Heterotetracystis*, *Hormidiospora*, *Hormidium*, *Hormotila*, *Hormotilopsis*, *Hyalococcus*, *Hyalodiscus*, *Hyalogonium*, *Hyaloraphidium*, *Hydrodictyon*, *Hypnomonas*, *Ignatius*, *Interfilum*, *Kentrosphaera*, *Keratococcus*, *Kermatia*, *Kirchneriella*, *Koliella*, *Lagerheimia*, *Lautosphaeria*, *Leptosira*, *Lobocystis*, *Lobomonas*, *Lola*, *Macrocloris*, *Marvania*, *Micractinium*, *Microdictyon*, *Microspora*, *Monoraphidium*, *Muriella*, *Mychonastes*, *Nanoclorum*, *Nautococcus*, *Neglectella*, *Neochloris*, *Neodesmus*, *Neomeris*, *Neospongiococcum*, *Nephrochlamys*, *Nephrocystium*, *Nephrodiella*, *Oedocladium*, *Oedogonium*, *Oocystella*, *Oocystis*, *Oonephris*, *Ourococcus*, *Pachycladella*, *Palmella*, *Palmellococcus*, *Palmellopsis*, *Palmodictyon*, *Pandorina*, *Paradoxia*, *Parietocloris*, *Pascherina*, *Paulschulzia*, *Pectodictyon*, *Pediastrum*, *Pedinomonas*, *Pedinopera*, *Percursaria*, *Phacotus*, *Phaeophila*, *Physocytium*, *Pilina*, *Planctonema*, *Planktosphaeria*, *Platydictyon*, *Platymonas*, *Pleodorina*, *Pleurastrum*, *Pleurococcus*, *Ploeotila*, *Poliedriopsis*, *Poliphysa*, *Polytoma*, *Polytomella*, *Prasinocladus*, *Prasiococcus*, *Protoderma*, *Protosiphon*, *Pseudendocloniopsis*, *Pseudocharacium*, *Pseudochlorella*, *Pseudochlorococcum*, *Pseudococcomyxa*, *Pseudodictyosphaerium*, *Pseudodidymocystis*, *Pseudokirchneriella*, *Pseudopleurococcus*, *Pseudoschizomeris*, *Pseudoschroederia*, *Pseudostichococcus*, *Pseudotetracystis*, *Pseudotetradron*, *Pseudotrebouxia*, *Pteromonas*, *Pulchrasphaera*, *Pyramimonas*, *Pyrobotrys*, *Quadrigula*, *Radiofilum*, *Radiosphaera*, *Raphidocelis*, *Raphidonema*, *Raphidonemopsis*, *Rhizoclonium*, *Rhopalosolen*, *Saprochaete*, *Scenedesmus*, *Schizochlamys*, *Schizomeris*, *Schroederia*, *Schroederiella*, *Scotiellopsis*, *Siderocystopsis*, *Siphonocladus*, *Sirogonium*, *Sorastrum*, *Spermatozopsis*, *Sphaerella*, *Sphaerellopsis*, *Sphaerocystis*, *Sphaeroplea*, *Spirotaenia*, *Spongiocloris*, *Spongiococcum*, *Stephanoptera*, *Stephanosphaera*, *Stigeoclonium*, *Struvea*, *Tetmemorus*, *Tetrabaena*, *Tetracystis*, *Tetradismus*, *Tetradion*, *Tetralantos*, *Tetraselmis*, *Tetraspora*, *Tetrastrum*, *Treubaria*, *Triploceros*, *Trochiscia*, *Trochisciopsis*, *Ulva*, *Uronema*, *Valonia*, *Valoniopsis*, *Ventricaria*, *Viridiella*, *Vitreochlamys*, *Volvox*, *Volulina*, *Westella*, *Willea*, *Wislouchiella*, *Zoochlorella*, *Zygnemopsis*, *Hyalotheca*, *Chlorella*, *Pseudopleurococcum* y *Rhopalocystis*. Prasinophyceae incluye *Heteromastix*, *Mammella*, *Mantoniella*, *Micromonas*, *Nephroselmis*, *Ostreococcus*, *Prasinocladus*, *Prasinococcus*, *Pseudoscourfieldia*, *Pycnococcus*, *Piraimonas*, *Scherffelia*. Pedinophyceae incluye *Marsupiomonas*, *Pedinomonas*, *Resultor*. Trebouxiophyceae incluye *Apatococcus*, *Asterocloris*, *Auxenochlorella*, *Chlorella*, *Coccomyxa*, *Desmococcus*, *Dictyocloropsis*, *Elliptocloris*, *Jaagiiella*, *Leptosira*, *Lobococcus*, *Makinoella*, *Microthamnion*, *Myrmecia*, *Nannocloris*, *Oocystis*, *Prasiola*, *Prasiolopsis*, *Prototheca*, *Stichococcus*, *Tetrachlorella*, *Trebouxia*, *Trichophilus*,

Watanabea y *Myrmecia*. Ulvophyceae incluye *Acrochaete*, *Bryopsis*, *Cephaleuros*, *Chlorocystis*, *Enteromorpha*, *Gloeotilopsis*, *Halochlorococcum*, *Ostreobium*, *Pirula*, *Pithophora*, *Planophila*, *Pseudendoclonium*, *Trentepohlia*, *Trichosarcina*, *Ulothrix*, *Bolbocoleon*, *Chaetosiphon*, *Eugomontia*, *Oltmannsiellopsis*, *Pringsheimiella*, *Pseudodendroclonium*, *Pseudulvella*, *Sporocladopsis*, *Urospora* y *Wittrockiella*.

- 5 Rhodophyta incluye *Acrochaetium*, *Agardhiella*, *Antithamnion*, *Antithamnionella*, *Asterocytis*, *Audouinella*, *Balbiana*, *Bangia*, *Batrachospermum*, *Bonnemaisionia*, *Bostrychia*, *Callithamnion*, *Caloglossa*, *Ceramium*, *Champia*, *Chroodactilon*, *Chrootheca*, *Compsopogon*, *Compsopogonopsis*, *Cumagloia*, *Cyanidium*, *Cystoclonium*, *Dasya*, *Digenia*, *Dixoniella*, *Erythrocladia*, *Erythrolobas*, *Erythrotrichia*, *Flintiella*, *Galdieria*, *Gelidium*, *Glaucosphaera*, *Goniotrichum*, *Gracilaria*, *Grateloupia*, *Griffithsia*, *Hildenbrandia*, *Hymenocladopsis*, *Hipnea*, *Laingia*,
10 *Membranoptera*, *Myriogramme*, *Nemalion*, *Nemalionopsis*, *Neogardhiella*, *Palmaria*, *Phyllophora*, *Polyneura*, *Polysiphonia*, *Porphyra*, *Porphyridium*, *Pseudochantransia*, *Pterocladia*, *Pugetia*, *Rhodella*, *Rhodochaete*, *Rhodochorton*, *Rhodorus*, *Rhodospira*, *Rhodymenia*, *Sirospora*, *Selenastrum*, *Sirodotia*, *Solieria*, *Spermothamnion*, *Spiridia*, *Stilonema*, *Thorea*, *Trailiella* y *Tuomeya*.

- 15 Cryptophyta incluye Cryptophyceae. Más específicamente, *Campylomonas*, *Chilomonas*, *Chroomonas*, *Cryptochrysis*, *Cryptomonas*, *Goniomonas*, *Guillardia*, *Hanusia*, *Hemiselmis*, *Plagioselmis*, *Proteomonas*, *Pyrenomonas*, *Rhodomonas* y *Stroeatula*.

Chlorarachniophyta incluye *Chlorarachnion*, *Lotharella* y *Chattonella*.

- Haptophyta incluye *Apistonema*, *Chrysochromulina*, *Coccolithophora*, *Corcontochrysis*, *Cricosphaera*, *Diacronema*, *Emiliana*, *Pavlova*, *Ruttenra*, *Cruciplacolithus*, *Prymnesium*, *Isochrysis*, *Calyptrosphaera*, *Chrysotila*, *Coccolithus*,
20 *Dicrateria*, *Heterosigma*, *Hymenomonas*, *Imantonia*, *Gephyrocapsa*, *Ochrosphaera*, *Phaeocystis*, *Platyachrysis*, *Pseudoisochrysis*, *Syracosphaera* y *Pleurochrysis*.

Euglenophyta incluye stasia, *Colacium*, *Cyclidiopsis*, *Distigma*, *Euglena*, *Eutreptia*, *Eutreptiella*, *Gyropaigne*, *Hyalophacus*, *Khawkinia* Astasia, *Lepocinclis*, *Menidium*, *Parmidium*, *Phacus*, *Rhabdomonas*, *Rhabdospira*, *Tetruetrepia* y *Trachelomonas*

- 25 Heterokontophyta incluye *Bacillariophyceae*, *Phaeophyceae*, *Pelagophyceae*, *Xanthophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Syanurophyceae*, *Phaeothamniophyceae* y *Raphidophyceae*. Más específicamente, *Bacillariophyceae* incluye *Achnanthes*, *Amphora*, *Chaetoceros*, *Bacillaria*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Pinnularia*. *Phaeophyceae* incluye *Ascoseira*, *Asterocladon*, *Bodanella*, *Desmarestia*, *Dictyocha*, *Dictyota*, *Ectocarpus*, *Halopteris*, *Heribaudiella*, *Pleurocladia*, *Porterinema*, *Pilaiella*, *Sorocarpus*, *Spermatocnus*, *Sphacelaria* y *Waerniella*. *Pelagophyceae* incluye *Aureococcus*,
30 *Aureoumbra*, *Pelagococcus*, *Pelagomonas*, *Pulvinaria* y *Sarcinochrysis*. *Xanthophyceae* incluye *Chloramoebales*, *Rhizocloridales*, *Mischococcales*, *Tribonematales* y *Vaucheriales*. *Eustigmatophyceae* incluye *Chloridella*, *Ellipsoidion*, *Eustigmatos*, *Monodopsis*, *Monodus*, *Nannochloropsis*, *Polyedriella*, *Pseudocharaciopsis*, *Pseudostaurastrum* y *Vischeria*. *Syanurophyceae* incluye *allomonas*, *Synura* y *Tessellaria*. *Phaeothamniophyceae* incluye *haeobotrys* y *Phaeothamnion*. *Raphidophyceae* incluye *Olisthodiscus*, *Vacuolaria* y *Fibrocapsa*.

- 35 Diatomea incluye *Bolidophyceae*, *Coscinodiscophyceae*, *Dinophyceae* y *Alveolata*. *Bolidophyceae* incluye *Bolidomonas*, *Chrysophyceae*, *Giraudyopsis*, *Glossomastix*, *Chromophyton*, *Chrysamoeba*, *Chrysochaete*, *Chrysodidymus*, *Chrysosphaera*, *Chrysosaccus*, *Chrysosphaera*, *Chrysoxis*, *Cyclonexis*, *Dinobryon*, *Epichrysis*, *Epipyxis*, *Hibberdia*, *Lagynion*, *Lepochromulina*, *Monas*, *Monochrysis*, *Paraphysomonas*, *Phaeoplaca*, *Phaeoschizochlamys*, *Picophagus*, *Pleurochrysis*, *Stichogloea* y *Uroglena*. *Coscinodiscophyceae* incluye
40 *Bacteriastrium*, *Bellerochea*, *Biddulphia*, *Brockmanniella*, *Coretron*, *Coscinodiscus*, *Eucampia*, *Extubocellulus*, *Guinardia*, *Helicotheca*, *Leptocylindrus*, *Leyanella*, *Lithodesmium*, *Melosira*, *Minidiscus*, *Odontella*, *Planktoniella*, *Porocira*, *Proboscia*, *Rhizosolenia*, *Stellarima*, *Thalassionema*, *Bicosoecid*, *Symbiomonas*, *Actinocyclus*, *Amphora*, *Arcozellulus*, *Detonula*, *Diatoma*, *Ditilum*, *Frugilariophyceae*, *Asterionellopsis*, *Delphineis*, *Grammatophora*, *Nanofrustulum*, *Synedra* y *Tabularia*. *Dinophyceae* incluye *Adenoides*, *Alexandrium*, *Amphidinium*, *Ceratium*,
45 *Ceratocorys*, *Coolia*, *Cryptocodinium*, *Exuviaella*, *Gambierdiscus*, *Gonyaulax*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Heterocapsa*, *Katodinium*, *Lingulodinium*, *Pfiesteria*, *Polarella*, *Protoceratium*, *Pyrocystis*, *Scrippsiella*, *Symbiodinium*, *Thecadinium*, *Thoracosphaera*, y *Zooxanthella*. *Alveolata* incluye *Cystodinium*, *Glenodinium*, *Oxirrhis*, *Peridinium*, *Prorocentrum* y *Woloszynskia*.

Métodos de cultivo de microorganismos y biorreactores

- 50 Los microorganismos se cultivan generalmente tanto para fines de llevar a cabo manipulaciones genéticas como para la posterior producción de hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos). El primer tipo de cultivo se lleva a cabo generalmente a pequeña escala e inicialmente, al menos, en condiciones en las que el microorganismo de partida puede crecer. El cultivo para fines de producción de hidrocarburos se lleva a cabo habitualmente a gran escala. Preferiblemente, está presente una fuente de carbono fija (por ejemplo una
55 materia prima). El cultivo también puede exponerse a luz parte o todo el tiempo.

Biorreactor

Las microalgas pueden cultivarse en medios líquidos. El cultivo puede contenerse dentro de un biorreactor. Las

microalgas también pueden cultivarse en fotobiorreactores que contienen una fuente de carbono fija y permiten que la luz incida en las células. La exposición de células de microalgas a la luz, incluso en presencia de una fuente de carbono fija que las células transportan y utilizan, puede acelerar el crecimiento en comparación con el cultivo de células en la oscuridad. Los parámetros de la condición de cultivo pueden manipularse para optimizar la producción de hidrocarburos total, la combinación de especies de hidrocarburo producidas y/o la producción de una especie de hidrocarburo.

La figura 1 es una realización de un biorreactor de la invención. En un aspecto, un biorreactor es un fotobiorreactor. En un aspecto, puede usarse un sistema de biorreactor para cultivar microalgas. El sistema de biorreactor puede incluir un recipiente y un conjunto de irradiación, en el que el conjunto de irradiación se acopla operativamente al recipiente.

En un aspecto, un biorreactor es un tanque de fermentación usado para procesos de fermentación industrial.

En algunas realizaciones, un biorreactor incluye tanques de vidrio, metal o plástico, equipados con, por ejemplo, medidores y ajustes para controlar la aireación, velocidad de agitación, temperatura, pH y otros parámetros de interés. Generalmente, los medidores y ajustes se acoplan operativamente al biorreactor.

En un aspecto, un biorreactor puede ser lo suficientemente pequeño para aplicaciones de sobremesa (5-10 l o menos) o hasta 120.000 l o más de capacidad para aplicaciones a gran escala industrial.

En algunas realizaciones, el sistema de biorreactor puede incluir una estructura de difusión de luz o una pluralidad de estructuras de difusión de luz. En algunas realizaciones, una o más de las estructuras de difusión de luz de la pluralidad de estructuras de difusión de luz se ubican a lo largo de la superficie interior del biorreactor. En algunas realizaciones, la estructura de difusión de luz se acopla operativamente al biorreactor.

El sistema de biorreactor puede incluir una o más fibras ópticas y/o una pluralidad de fuentes de luz y/o una fuente de luz. En algunas realizaciones, la una o más fibras ópticas se montan en estructuras de iluminación protectoras y ópticamente transparentes. En algunas realizaciones, la fibra óptica se acopla operativamente al biorreactor. En algunas realizaciones, la fuente de luz se acopla operativamente al biorreactor.

En algunas realizaciones, el sistema de biorreactor puede incluir una estructura de iluminación acoplada operativamente a un biorreactor. En determinadas realizaciones en el presente documento, una estructura de iluminación puede tener cualquier conformación o forma ya que dirige la señal de luz al interior de un biorreactor. El sistema de biorreactor también puede incluir al menos una fibra óptica que se extiende desde un primer extremo de al menos una de las una o más fibras ópticas hasta una parte de un colector de energía solar. En algunas realizaciones, el colector de energía solar se acopla operativamente al biorreactor. La fibra óptica puede adaptarse para acoplar ópticamente el colector de energía solar al biorreactor. La fibra óptica puede acoplarse ópticamente (directa o indirectamente) al colector de energía solar.

En algunas realizaciones, el sistema de biorreactor incluye una pluralidad de fuentes de luz unidas operativamente al biorreactor. La pluralidad de fuentes de luz puede incluir múltiples LED. La pluralidad de fuentes de luz que comprenden múltiples LED puede funcionar para suministrar espectro completo o una longitud de onda específica de luz artificial a un biorreactor.

En una realización, se monta un LED en estructuras de iluminación protectoras y ópticamente transparentes. En una realización el LED es una serie de LED.

En algunas realizaciones, pueden hacerse crecer microalgas y mantenerse en biorreactores cerrados hechos de diferentes tipos de material transparente o semitransparente. Tal material puede incluir recintos de Plexiglass™, recintos de vidrio, bolsas hechas de sustancias tales como polietileno, tubos transparentes o semitransparentes y otros materiales. Las microalgas pueden hacerse crecer y mantenerse en biorreactores abiertos tales como estanques de canal, estanques de decantación y otros recipientes no cerrados.

El contenido en gas de un biorreactor para hacer crecer microorganismos como microalgas puede manipularse. Parte del volumen de un biorreactor puede contener gas en lugar de líquido. Las entradas de gas pueden usarse para bombear gases al interior del biorreactor. Cualquier gas puede bombearse al interior de un biorreactor, incluyendo aire, mezclas de aire/O₂, gases nobles tales como argón y otros. La velocidad de entrada de un gas en un biorreactor también puede manipularse. Aumentar el flujo de gas en un biorreactor aumenta la turbidez de un cultivo de microalgas. La colocación de puertos que transportan gases al interior de un biorreactor también puede afectar la turbidez de un cultivo a una velocidad de flujo de gas dada. Las mezclas de aire/O₂ pueden modularse para generar cantidades óptimas de O₂ para máximo crecimiento por un organismo particular. Las microalgas crecen significativamente más rápido en la luz bajo, por ejemplo, el 3% de O₂/el 97% de aire que en el 100% de aire. El 3% de O₂/el 97% de aire es aproximadamente 100 veces más O₂ que el encontrado en el aire. Por ejemplo, pueden infundirse mezclas de aire:O₂ de aproximadamente el 99,75% de aire:el 0,25% O₂, aproximadamente el 99,5% de aire:el 0,5% de O₂, aproximadamente el 99,0% de aire:el 1,00% de O₂, aproximadamente el 98,0% de aire:el 2,0% de O₂, aproximadamente el 97,0% de aire:el 3,0% de O₂, aproximadamente el 96,0% de aire:el 4,0% de O₂, y aproximadamente el 95,00% de aire:el 5,0% O₂ en un biorreactor o biorreactor.

Los cultivos de microalgas también pueden someterse a mezclado usando dispositivos tales como cuchillas giratorias e impulsores, oscilación de un cultivo, barras de agitación, infusión de gas presurizado, y otros instrumentos.

Los biorreactores pueden tener puertos que permiten la entrada de gases, sólidos, semisólidos y líquidos al interior de la cámara que contiene las microalgas. Los puertos se unen habitualmente a tuberías u otros medios de transportar sustancias. Los puertos de gas, por ejemplo, transportan gases al cultivo. Bombear gases al interior de un biorreactor puede servir tanto para alimentar a las células O_2 y otros gases como para airear el cultivo y, por tanto, generar turbidez. La cantidad de turbidez de un cultivo varía según se altera el número y la posición de puertos de gas. Por ejemplo, pueden colocarse puertos de gas a lo largo del fondo de una bolsa de polietileno cilíndrica. Las microalgas crecen más rápido cuando se añade O_2 a aire y se hace burbujear al interior de un biorreactor.

Los biorreactores tienen preferiblemente uno o más puertos que permiten la entrada de los medios. No es necesario que sólo una sustancia entre en o salga de un puerto. Por ejemplo, puede usarse un puerto para hacer fluir medios de cultivo al interior del biorreactor y después puede usarse para muestreo, entrada de gas, salida de gas u otros fines. En algunos casos un biorreactor se carga con medios de cultivo al inicio de un cultivo y no se infunden más medios de crecimiento después de que se inocule el cultivo. En otras palabras, la biomasa de microalgas se cultiva en un medio acuoso durante un periodo de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número; sin embargo cantidades de medio de cultivo acuoso no se hacen fluir a través del biorreactor en todo el periodo de tiempo. Por tanto en algunas realizaciones, no se hace fluir medio de cultivo acuoso a través del biorreactor después de la inoculación.

En otros casos, pueden hacerse fluir medios de cultivo a través del biorreactor en todo el periodo de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número. En algunas realizaciones, se infunden medios en el biorreactor después de la inoculación pero antes de que las células alcancen una densidad deseada. En otras palabras, no se mantiene un régimen de flujo turbulento de entrada de gas y entrada de medios para la reproducción de microalgas hasta que se ha logrado un aumento deseado en el número de dichas microalgas.

Los biorreactores tienen preferiblemente uno o más puertos que permiten la entrada de gas. El gas puede servir tanto para proporcionar nutrientes tales como O_2 así como para proporcionar turbulencia en los medios de cultivo. Puede lograrse turbulencia colocando un puerto de entrada de gas por debajo del nivel de los medios de cultivo acuosos de modo que el gas que entra en el biorreactor se hace burbujear hasta la superficie del cultivo. Uno o más puertos de salida de gas permiten que el gas se escape, evitando de ese modo una acumulación de presión en el biorreactor. Preferiblemente, un puerto de salida de gas conduce a una válvula "unidireccional" que evita que microorganismos contaminantes entren en el biorreactor. En algunos casos, se cultivan células en un biorreactor durante un periodo de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número, sin embargo un régimen de flujo turbulento con remolinos turbulentos predominantemente en todos los medios de cultivo provocado por la entrada de gas no se mantiene durante todo el periodo de tiempo. En otros casos, puede mantenerse un régimen de flujo turbulento con remolinos turbulentos predominantemente en todos los medios de cultivo provocado por la entrada de gas durante todo el periodo de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número. En algunos casos no se mantiene un intervalo de razones predeterminado entre la escala del biorreactor y la escala de remolinos durante el periodo de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número. En otros casos puede mantenerse un intervalo de este tipo.

Los biorreactores tienen preferiblemente al menos un puerto que puede usarse para muestrear el cultivo. Preferiblemente, puede usarse repetidamente un puerto de muestreo sin alterar comprometiendo la naturaleza axénica del cultivo. Un puerto de muestreo puede configurarse con una válvula u otro dispositivo que permite que el flujo de muestra se detenga y se inicie. Alternativamente un puerto de muestreo puede permitir el muestreo continuo. Los biorreactores tienen preferiblemente al menos un puerto que permite la inoculación de un cultivo. También puede usarse un puerto de este tipo para otros fines tales como entrada de gas o medios.

En una realización, puede usarse un biorreactor con un sistema de irradiación para producir hidrocarburo a partir de *Botryococcus*. Los botriococenos son triterpenos isoprenoides no ramificados que tienen la fórmula C_nH_{2n-10} . La clase A produce alcadienos y alcatrienos (derivados de ácidos grasos) en donde n es un número impar de 23 a 31. La clase B produce botriococenos en donde n está en el intervalo de 30 a 40. Estos pueden ser biocombustibles de elección para hidrocarburos de hidrocrackeo y de tipo gasolina.

Medios

El medio de cultivo de microalgas contiene normalmente componentes tales como una fuente de nitrógeno fija, elementos traza, opcionalmente un tampón para mantenimiento del pH, y fosfato. Otros componentes pueden incluir una fuente de carbono fija tal como acetato o glucosa, y sales tales como cloruro de sodio, particularmente para microalgas marinas. Los ejemplos de elementos traza incluyen zinc, boro, cobalto, cobre, manganeso y molibdeno en, por ejemplo, las formas respectivas de $ZnCl_2$, H_3BO_3 , $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ y $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$.

Para organismos capaces de crecer sobre una fuente de carbono fija, la fuente de carbono fija puede ser, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, xilosa, manosa, ramnosa, N-acetilglucosamina, glicerol, floridósido, y/o ácido glucurónico. La una o más fuentes de carbono pueden proporcionarse a una concentración de menos de 50 μM , al menos aproximadamente 50 μM , al menos aproximadamente 100 μM , al menos aproximadamente 500 μM , al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 500 mM, y más de 500 mM de una o más fuentes de carbono fijas proporcionadas de manera exógena. La una o más fuentes de carbono pueden proporcionarse a menos del 1%, el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22%, el 23%, el 24%, el 25%, el 26%, el 27%, el 28%, el 29%, el 30%, el 31%, el 32%, el 33%, el 34%, el 35%, el 36%, el 37%, el 38%, el 39%, el 40%, el 41%, el 42%, el 43%, el 44%, el 45%, el 46%, el 47%, el 48%, el 49%, el 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59%, el 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de los medios. La una o más fuentes de carbono también pueden proporcionarse a un porcentaje de los medios entre los porcentajes indicados anteriormente, por ejemplo, el 2,5% o el 3,7% de los medios.

Algunos microorganismos crecen naturalmente o pueden modificarse por ingeniería genética para que crezcan sobre una fuente de carbono fija que es una fuente heterogénea de compuestos tales como residuos municipales, aguas negras tratadas de manera secundaria, aguas residuales y otras fuentes de carbono fijas y otros nutrientes tales como sulfatos, fosfatos y nitratos. El componente de las aguas negras sirve como fuente de nutrientes en la producción de hidrocarburos, y el cultivo proporciona una fuente económica de hidrocarburos.

También pueden manipularse otros parámetros de cultivo, tales como el pH de los medios de cultivo, la identidad y concentración de elementos traza y otros constituyentes del medio.

Se encuentran microorganismos útiles según los métodos de la presente invención en diversas ubicaciones y entornos en todo el mundo. Como consecuencia de su aislamiento de otras especies y su divergencia evolutiva resultante, el medio de crecimiento particular para crecimiento óptimo y generación de constituyentes lipídicos y/o de hidrocarburos puede variar. En algunos casos, determinadas cepas de microorganismos pueden ser incapaces de crecer sobre un medio de crecimiento particular debido a la presencia de algún componente inhibidor o la ausencia de algún requisito nutricional esencial requerido por la cepa particular de microorganismo.

Los medios de crecimiento sólidos y líquidos están generalmente disponibles de una amplia variedad de fuentes, y pueden encontrarse instrucciones para la preparación de medios particulares que son adecuados para una amplia variedad de cepas de microorganismos, por ejemplo, en línea en el sitio mantenido por la Universidad de Texas en Austin para su colección de cultivo de algas (UTEX).

Las condiciones del proceso pueden ajustarse para aumentar el rendimiento de lípidos adecuados para un uso particular y/o para reducir el coste de producción. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se cultiva un microbio (por ejemplo, microalgas) en presencia de una concentración limitativa de uno o más nutrientes, tales como, por ejemplo, carbono y/o nitrógeno, fósforo, o azufre, mientras se proporcionan un exceso de energía de carbono fija tal como glucosa. La limitación de nitrógeno tiende a aumentar el rendimiento lipídico microbiano con respecto al rendimiento lipídico microbiano en un cultivo en el que se proporciona nitrógeno en exceso. En realizaciones particulares, el aumento en el rendimiento lipídico es de al menos aproximadamente: el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 75%, el 100%, el 200%, el 300%, el 400% o el 500%. El microbio puede cultivarse en presencia de una cantidad limitativa de un nutriente durante una parte del periodo de cultivo total o durante todo el periodo. En realizaciones particulares, la concentración de nutrientes se cicla entre una concentración limitativa y una concentración no limitativa al menos dos veces durante el periodo de cultivo total.

Crecimiento heterótrofo y luz

Los microorganismos pueden cultivarse en condiciones de crecimiento heterótrofo en las que una fuente de carbono fija proporciona energía para crecimiento y acumulación de lípidos.

Se conocen métodos convencionales para el crecimiento heterótrofo y propagación de microalgas (véase, por ejemplo Miao y Wu, J Biotechnology, 2004, 11:85-93 y Miao y Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846).

Para la producción de hidrocarburos, pueden cultivarse o fermentarse células en grandes cantidades, incluyendo células recombinantes de la invención descritas en el presente documento. El cultivo puede ser en grandes volúmenes de líquido, tales como en cultivos en suspensión como ejemplo. Otros ejemplos incluyen empezar con un pequeño cultivo de células que se expande en una gran biomasa en combinación con crecimiento y propagación celular así como producción de hidrocarburos. Pueden usarse biorreactores o fermentadores de acero para acomodar grandes volúmenes de cultivo. Un biorreactor puede incluir un fermentador. Un fermentador similar a los usados en la producción de cerveza y/o vino puede ser adecuado, como lo son los fermentadores extremadamente grandes usados en la producción de etanol.

Se proporcionan fuentes de nutrientes apropiadas para cultivo en un fermentador. Estas incluyen materias primas

tales como una o más de las siguientes: una fuente de carbono fija tal como glucosa, almidón de maíz, material celulósico despolimerizado, sacarosa, caña de azúcar, remolacha azucarera, lactosa, suero de leche o melaza; una fuente de grasa, tal como grasas o aceites vegetales; una fuente de nitrógeno, tal como proteína, soja triturada, licor de maceración de maíz, amoníaco (puro o en forma de sal), nitrato o sal de nitrato, o nitrógeno molecular; y una fuente de fósforo, tal como sales de fosfato. Además, un fermentador permite el control de condiciones de cultivo tales como temperatura, pH, tensión de oxígeno y niveles de dióxido de carbono. Opcionalmente, pueden hacerse burbujear componentes gaseosos, como oxígeno o nitrógeno, a través de un cultivo líquido. Otras fuentes de almidón (glucosa) tales como trigo, patata, arroz y sorgo. Otras fuentes de carbono incluyen corrientes del proceso tales como glicerol de calidad técnica, licor negro, ácidos orgánicos tales como acetato y melaza. También pueden proporcionarse fuentes de carbono como una mezcla, tal como una mezcla de sacarosa y pulpa de remolacha azucarera despolimerizada.

Puede usarse un fermentador para permitir que las células experimenten las diversas fases de su ciclo de crecimiento. Como ejemplo, puede introducirse un inóculo de células que producen hidrocarburos en un medio seguido por un periodo de retraso (fase de retraso) antes de que las células empiecen a crecer. Tras el periodo de retraso, la tasa de crecimiento aumenta paulatinamente y entra en la fase logarítmica o exponencial. La fase exponencial es seguida a su vez por un retardo del crecimiento debido a disminuciones en nutrientes y/o aumenta en sustancias tóxicas. Después de este retardo, el crecimiento se detiene, y las células entran en una fase estacionaria o estado estable, según el entorno particular proporcionado a las células.

La producción de hidrocarburos mediante células dadas a conocer en el presente documento puede producirse durante la fase logarítmica o después de la misma, incluyendo la fase estacionaria en la que se suministran nutrientes, o todavía están disponibles, para permitir la continuación de producción de hidrocarburos en ausencia de división celular.

Preferiblemente, los microorganismos hechos crecer usando condiciones descritas en el presente documento y conocidos en la técnica comprenden al menos aproximadamente el 20% en peso de lípidos, preferiblemente al menos aproximadamente el 40% en peso, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50% en peso, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 60% en peso.

En un método de crecimiento heterótrofo alternativo según la presente invención, los microorganismos pueden cultivarse usando biomasa celulósica despolimerizada como materia prima. La biomasa celulósica (por ejemplo, rastrojo, tal como rastrojo de maíz) es económica y está fácilmente disponible; sin embargo, los intentos por usar este material como materia prima para levadura han fracasado. En particular, se ha encontrado que tal materia prima es inhibidora del crecimiento de levaduras, y las levaduras no pueden usar los azúcares de 5 carbonos producidos a partir de materiales celulósicos (por ejemplo, xilosa de hemicelulosa). En cambio, las microalgas pueden crecer sobre material celulósico procesado. Por consiguiente, la invención proporciona un método de cultivo de microalgas en presencia de un material celulósico y/o un azúcar de 5 carbonos.

Los materiales celulósicos adecuados incluyen residuos de cultivos energéticos herbáceos y leñosos, así como cultivos agrícolas, es decir, las partes de la planta, principalmente tallos y hojas, que no se retiran de los campos con el producto de fibra o alimento primario. Los ejemplos incluyen residuos agrícolas tales como bagazo de caña de azúcar, cascarillas de arroz, fibra de maíz (incluyendo tallos, hojas, cáscaras y mazorcas), paja de trigo, paja de arroz, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítricos, pieles de cítricos; residuos forestales tales como aclareo de madera dura y madera blanda, y residuos de madera dura y madera blanda de operaciones madereras; residuos de madera tales como residuos de serrería (virutas de madera, serrín) y residuos de fábricas de celulosa; residuos urbanos tales como fracciones de papel de residuos sólidos municipales, residuos de madera urbanos y residuos vegetales urbanos tales como recortes de hierbas municipales; y residuos de construcción de madera. Los materiales celulósicos adicionales incluyen cultivos celulósicos dedicados tales como pasto varilla, madera de álamo híbrido, y *Miscanthus*, fibra de caña y sorgo de fibra. Los azúcares de cinco carbonos que se producen a partir de tales materiales incluyen xilosa.

En todavía otro método de crecimiento heterótrofo alternativo según la presente invención, que puede usarse en sí opcionalmente en combinación con los métodos descritos anteriormente, se usa sacarosa, producida, por ejemplo, a partir de caña de azúcar o remolacha azucarera, como materia prima.

El crecimiento heterótrofo puede incluir el uso de tanto fuente(s) de luz como de carbono fija(s) para que crezcan las células y produzcan hidrocarburos. El crecimiento heterótrofo puede llevarse a cabo en un fotobiorreactor.

Los biorreactores pueden exponerse a una o más fuentes de luz para proporcionar una señal luminosa a las microalgas. Puede proporcionarse una señal luminosa a través de la luz dirigida a una superficie del biorreactor por una fuente de luz. Preferiblemente, la fuente de luz proporciona una intensidad que es suficiente para que las células crezcan, pero no tan intensa como para provocar daño oxidativo o provocar una respuesta fotoinhibidora. En algunos casos, una fuente de luz tiene un intervalo de longitud de onda que imita o aproximadamente imita el intervalo del sol. En otros casos, se usa un intervalo de longitud de onda diferente. Los biorreactores pueden colocarse al aire libre o en un invernadero u otra instalación que permita que la luz del sol incida sobre la superficie. En algunas realizaciones, las intensidades de fotones para especies del género *Botryococcus* están entre 25 y

500 $\mu\text{mE m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (véase, por ejemplo, Photosynth Res. Junio de 2005; 84 (1-3): 21-7).

El número de fotones que incide sobre un cultivo de células de microalgas puede manipularse, así como otros parámetros tales como el espectro de longitud de onda y la razón de horas de oscuridad:luz al día. Las microalgas también pueden cultivarse en luz natural, así como combinaciones simultáneas y/o alternantes de luz natural y luz artificial. Por ejemplo, pueden cultivarse microalgas bajo luz natural durante las horas de luz solar y bajo luz artificial durante las horas de noche.

En un aspecto de la invención, se expone un microorganismo a aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 1% de irradiancia de luz requerida para la fotosíntesis, preferiblemente de aproximadamente el 0,3% a aproximadamente el 0,8% de irradiancia de luz requerida para la fotosíntesis por el organismo. La irradiancia de luz típica puede estar entre 0,1 - 300 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ incluyendo menos de 0,1, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 a 99, 100, 101 a 149, 150, 151, a 199, 200, 201 a 249, 250, o más de 250 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La irradiancia de luz puede ser de aproximadamente 0,01-1 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, preferiblemente entre 1-10 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o entre 10-100 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o entre 100-300 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o entre 100-300 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. También se incluyen irradiancias de luz entre las irradiancias de luz indicadas anteriormente, por ejemplo, 1,1, 2,1, 2,5 o 3,5 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En un aspecto, pueden usarse diferentes espectros de luz (por ejemplo 360-700 nm). Los espectros de luz pueden ser de menos de 300, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o 750 nm o más. También se incluyen espectros de luz entre los espectros de luz indicados anteriormente, por ejemplo, 360 o 440 nm.

En una realización, la irradiación puede aplicarse de manera continua. En otra realización, la irradiación puede aplicarse en un patrón cíclico con un periodo apropiado de iluminación incluyendo pero sin limitarse a 12 h de luz: 12 h de oscuridad o 16 h de luz:8 h de oscuridad. Los patrones de luz pueden incluir menos de 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 h de luz y/o menos de 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 horas (h) de oscuridad. También se incluyen patrones de luz entre los patrones de luz indicados anteriormente, por ejemplo, 7,5 h de luz o 7,5 h de oscuridad.

En una realización, la irradiación puede ser luz solar natural recogida por un colector solar y transmitida al interior de un biorreactor a través de una fibra óptica.

En otra realización, puede usarse luz artificial, tal como diodos de emisión de luz (LED) o luz fluorescente como fuente de luz. En otra realización, pueden usarse juntas luz solar natural y luz artificial.

En una realización, la irradiación es un espectro de luz completo.

En otra realización, la irradiación es una longitud de onda de luz específica o un intervalo de luz de espectro transmitida a través de un filtro específico.

Métodos de recuperación de lípidos e hidrocarburos

Los hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos) producidos por las células de la invención pueden recolectarse, o recogerse de otra manera, mediante cualquier medio conveniente. Por ejemplo, los hidrocarburos secretados de las células pueden centrifugarse para separar los hidrocarburos en una capa hidrófoba de los contaminantes en una capa acuosa y, opcionalmente, de cualquier material sólido como precipitado después de la centrifugación. El material que contiene la célula o fracciones celulares puede tratarse con proteasas para degradar las proteínas contaminantes antes o después de la centrifugación. En algunos casos, las proteínas contaminantes están asociadas, posiblemente de manera covalente, a los hidrocarburos o precursores de hidrocarburos que forman hidrocarburos al eliminar la proteína. En otros casos, las moléculas de hidrocarburo están en una preparación que también contiene proteínas. Pueden añadirse proteasas a las preparaciones de hidrocarburos que contienen proteínas para degradar las proteínas (por ejemplo, puede usarse la proteasa de *Streptomyces griseus* (número de catálogo de SigmaAldrich P5147). Después de la digestión, los hidrocarburos se purifican preferiblemente a partir de proteínas residuales, fragmentos de péptidos y aminoácidos. Esta purificación puede lograrse, por ejemplo, mediante los métodos enumerados anteriormente, tales como centrifugación y filtración.

También pueden extraerse hidrocarburos extracelulares *in vivo* de células de microalgas vivas que luego se devuelven a un biorreactor mediante la exposición de las células, en un entorno por lo demás estéril, a un disolvente de extracción no tóxico, seguido de separación de las células vivas y la fracción hidrófoba del disolvente de extracción y los hidrocarburos, en la que las células vivas separadas se devuelven luego a un recipiente de cultivo, tal como un fermentador de acero inoxidable o un fotobiorreactor (véase Biotechnol Bioeng. 5 de diciembre de 2004; 88 (5): 593-600 y Biotechnol Bioeng. 5 de marzo de 2004; 85 (5): 475-81).

Los hidrocarburos también pueden aislarse mediante extracción de células completas. En primer lugar se rompen las células y luego pueden recogerse los hidrocarburos asociados a la pared celular/membrana celular e

intracelulares así como hidrocarburos extracelulares a partir de la masa de células completa, tal como mediante el uso de centrifugación tal como se describió anteriormente.

Están disponibles diversos métodos para separar hidrocarburos y lípidos de lisados celulares producidos por los métodos anteriores. Por ejemplo, pueden extraerse hidrocarburos con un disolvente hidrófobo tal como hexano (véase Frenz *et al.* 1989, *Enzima Microb. Technol.*, 11:717). También pueden extraerse hidrocarburos usando licuefacción (véase, por ejemplo Sawayama *et al.* 1999, *Biomass and Bioenergy* 17:33-39 e Inoue *et al.* 1993, *Biomass Bioenergy* 6(4):269-274); licuefacción de petróleo (véase por ejemplo Minowa *et al.* 1995, *Fuel* 74(12):1735-1738); y extracción de CO₂ supercrítico (véase por ejemplo Mendes *et al.* 2003, *Inorganica Chimica Acta* 356:328-334).

Miao y Wu describen un protocolo de la recuperación de lípidos de microalgas de un cultivo en el que las células se recolectaron mediante centrifugación, se lavaron con agua destilada y se secaron mediante secado por congelación. El polvo celular resultante se pulverizó en un mortero y luego se extrajo con n-hexano. Miao y Wu, *Biosource Technology* (2006) 97:841-846.

Lisado de células

Los lípidos e hidrocarburos intracelulares producidos en microorganismos se extraen, en algunas realizaciones, después de lisar las células del microorganismo. Una vez extraídos, los lípidos y/o hidrocarburos pueden refinarse adicionalmente para producir, por ejemplo, aceites, combustibles u oleoquímicos.

Tras la finalización del cultivo, los microorganismos pueden separarse del caldo de fermentación. Opcionalmente, la separación se efectúa por centrifugación para generar una pasta concentrada. La centrifugación no elimina cantidades significativas de agua intracelular de los microorganismos y no es una etapa de secado. Luego, la biomasa puede lavarse con una disolución de lavado (por ejemplo, agua desionizada) para deshacerse del caldo de fermentación y los residuos. Opcionalmente, la biomasa microbiana lavada también puede secarse (secarse en horno, liofilizarse, etc.) antes de la ruptura celular. Alternativamente, las células pueden lisarse sin separación de parte o todo el caldo de fermentación cuando la fermentación es completa. Por ejemplo, las células pueden estar a una razón de menos de 1:1 v:v células con respecto al líquido extracelular cuando las células se lisan.

Los microorganismos que contienen un lípido y/o hidrocarburo pueden lisarse para producir un lisado. Tal como se detalla en el presente documento, la etapa de lisar un microorganismo (también denominado lisis celular) puede lograrse mediante cualquier medio conveniente, incluyendo lisis inducida por calor, añadiendo una base, añadiendo un ácido, usando enzimas tales como proteasas y enzimas de degradación de polisacáridos tales como 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 moléculas intracelulares que se han producidas por el microorganismo. Cada uno de estos métodos para lisar un microorganismo puede usarse como un método único o en combinación de forma simultánea o secuencial.

El grado de ruptura celular puede observarse mediante análisis microscópico. Usando uno o más de los métodos descritos en el presente documento, se observa normalmente una ruptura celular de más del 70%. Preferiblemente, la ruptura celular es más del 80%, más preferiblemente más del 90% y lo más preferido es aproximadamente el 100%.

En realizaciones particulares, el microorganismo se lisa después del crecimiento, por ejemplo, para aumentar la exposición de lípidos celulares y/o hidrocarburos para extracción o procesamiento adicional. La sincronización de la expresión de la lipasa (por ejemplo, a través de un promotor inducible) o la lisis celular puede ajustarse para optimizar el rendimiento de lípidos y/o hidrocarburos. A continuación se describen varias técnicas de lisis. Estas técnicas pueden usarse individualmente o en combinación.

Lisis inducida por calor

En una realización preferida de la presente invención, la etapa de lisar un microorganismo comprende 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 aislada del caldo de fermentación) se calienta hasta que los microorganismos, es decir, las membranas y paredes celulares de microorganismos se degradan o descomponen. Normalmente, las temperaturas aplicadas son al menos 50 C. Se usan 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 más para más lisis celular eficaz.

El lisado de células mediante tratamiento térmico puede realizarse hirviendo el microorganismo. Alternativamente, puede realizarse tratamiento térmico (sin ebullición) en un autoclave. El lisado tratado por calor puede enfriarse para tratamiento adicional.

La ruptura celular también puede realizarse mediante tratamiento con vapor, es decir, mediante la adición de vapor presurizado. El tratamiento con vapor de microalgas para ruptura celular se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.750.048.

Lisis usando una base

En otra realización preferida de la presente invención, la etapa de lisar un microorganismo comprende añadir una base a una suspensión celular que contiene el microorganismo.

5 La base debe ser lo suficientemente fuerte como para hidrolizar al menos una porción de los compuestos proteicos de los microorganismos usados. Las bases que son útiles para solubilizar proteínas se conocen en la técnica de la química. Las bases ejemplares que son útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de litio, sodio, potasio, calcio y mezclas de los mismos. Una base preferida es KOH. El tratamiento con base de microalgas para la ruptura celular se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.750.048.

10 Lisis ácida

En otra realización preferida de la presente invención, la etapa de lisar un microorganismo comprende añadir un ácido a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La lisis con ácido puede afectarse usando un ácido a una concentración de 10-500 mM o preferiblemente 40-160 mM. La lisis con ácido se realiza preferiblemente por encima de temperatura ambiente (por ejemplo, a 40-160, y preferiblemente a temperatura de 50-130. Para 15 temperaturas moderadas (por ejemplo, temperatura ambiente hasta 100 C y particularmente temperatura ambiente hasta 65, el tratamiento con ácido puede combinarse de manera útil con sonicación u otros métodos de ruptura celular.

Lisado de células usando enzimas

En otra realización preferida de la presente invención, la etapa de lisar un microorganismo comprende lisar el 20 microorganismo usando una enzima. Enzimas preferidas para lisar un microorganismo son proteasas y enzimas de degradación de polisacáridos tales como hemicelulasa (por ejemplo, hemicelulasa de *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.; n.º H2125), pectinasa (por ejemplo, pectinasa de *Rhizopus* sp.; Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.; n.º P2401), Mannaway 4,0 I (Novozymes), celulasa (por ejemplo, celulosa de *Trichoderma viride*; Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.; n.º C9422), y driselasa (por ejemplo, driselasa de *Basidiomycetes* sp.; Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.; n.º 25 D9515).

Celulasas

En una realización preferida de la presente invención, una celulasa para lisar un microorganismo es una enzima de degradación de polisacáridos, opcionalmente de *Chlorella* o un virus de *Chlorella*.

Proteasas

30 Pueden usarse proteasas tales como proteasa de *Streptomyces griseus*, quimotripsina, proteinasa K, proteasas enumeradas en Degradation of Polylactide by Commercial Proteases, Oda Y *et al.*, Journal of Polymers and the Environment, volumen 8, número 1, enero de 2000, págs. 29-32(4) y otras proteasas para lisar microorganismos. Otras proteasas que pueden usarse incluyen Alcalasa 2.4 FG (Novozymes) y Flavourzyme 100 I (Novozymes).

Combinaciones

35 También puede usarse cualquier combinación de una proteasa y una enzima de degradación de polisacáridos, incluyendo cualquier combinación de las proteasas y enzimas de degradación de polisacáridos precedentes.

Lisado de células usando ultrasonidos

En otra realización preferida de la presente invención, la etapa de lisar un microorganismo se realiza usando 40 ultrasonidos, es decir, sonicación. Por tanto, las células también pueden lisarse con sonido de alta frecuencia. El sonido puede producirse electrónicamente y transportarse a través de una punta metálica a una suspensión celular adecuadamente concentrada. Esta sonicación (o ultrasonificación) altera la integridad celular basándose en la creación de cavidades en la suspensión celular.

Lisis mecánica

45 En otra realización preferida de la presente invención, la etapa de lisar un microorganismo se realiza mediante lisis mecánica. Las células pueden lisarse mecánicamente y, opcionalmente, homogeneizarse para facilitar la recogida de hidrocarburos (por ejemplo, lípidos). Por ejemplo, puede usarse un alterador de presión para bombear una célula que contiene una suspensión a través de una válvula de orificio restringida. Se aplica alta presión (hasta 1500 bar), seguida de una expansión instantánea a través de una boquilla de salida. La ruptura celular se logra mediante tres 50 mecanismos diferentes: impacto en la válvula, alto cizallamiento del líquido en el orificio y una caída repentina de la presión al descargar, lo que provoca una explosión de la célula. El método libera moléculas intracelulares.

Alternativamente, puede usarse un molino de bolas. En un molino de bolas, las células se agitan en suspensión con pequeñas partículas abrasivas, tales como perlas. Las células se rompen debido a las fuerzas de cizalladura,

molienda entre las perlas y las colisiones con las perlas. Las perlas rompen las células para liberar el contenido celular. Las células también pueden romperse por fuerzas de cizalladura, tales como con el uso de mezclador (tales como con una mezcladora Waring o de alta velocidad, por ejemplo), la prensa francesa, o incluso la centrifugación en caso de paredes celulares débiles, para romper las células.

5 Lisado de células mediante choque osmótico (citólisis)

En otra realización preferida de la presente invención, la etapa de lisar un microorganismo se realiza aplicando un choque osmótico.

Infección con un virus lítico

10 En una realización preferida de la presente invención, la etapa de lisar un microorganismo comprende la infección del microorganismo con un virus lítico. Se sabe que una amplia variedad de virus lisan microorganismos adecuados para su uso en la presente invención, y la selección y el uso de un virus lítico particular para un microorganismo particular está dentro del nivel de experiencia en la técnica.

15 Por ejemplo, el virus de *Chlorella* de *Paramecium bursaria* (PBCV-1) es el prototipo de un grupo (familia Phycodnaviridae, género *Chlorovirus*) de virus grandes, icosaedros, formadores de placa, de ADN bicatenario que se replican en, y lisan, determinadas algas verdes unicelulares, eucariotas, de tipo *Chlorella*. Por consiguiente, cualquier microalga susceptible puede lisarse infectando el cultivo con un virus de *Chlorella* adecuado. Véase, por ejemplo Adv. Virus Res. 2006; 66:293-336; Virology, 25 de abril de 1999; 257(1):15-23; Virology, 5 de enero de 2004; 318(1):214-23; Nucleic Acids Symp. Ser. 2000; (44):161-2; J. Virol. Marzo de 2006; 80(5):2437-44; y Annu. Rev. Microbiol. 1999; 53:447-94.

20 Autólisis (expresión de un gen lítico)

25 En otra realización preferida de la presente invención, la etapa de lisar un microorganismo comprende autólisis. En esta realización, un microorganismo según la invención está diseñado genéticamente para producir una proteína lítica que lisará el microorganismo. Este gen lítico puede expresarse usando un promotor inducible de modo que las células puedan crecer primero a una densidad deseable en un fermentador, seguido de la inducción del promotor para expresar el gen lítico para lisar las células. En una realización, el gen lítico codifica para una enzima de degradación de polisacáridos.

En otras determinadas realizaciones, el gen lítico es un gen de un virus lítico. Por tanto, por ejemplo, un gen lítico de un virus de *Chlorella* puede expresarse en una célula de alga del género *Chlorella*, tal como *C. protothecoides*.

30 En el presente documento se describen métodos de expresión adecuados con respecto a la expresión de un gen de lipasa. La expresión de genes líticos se realiza preferiblemente usando un promotor inducible, tal como un promotor activo en microalgas que está inducido por un estímulo tal como la presencia de una pequeña molécula, luz, calor y otros estímulos. Por ejemplo, véase Virology 260, 308-315 (1999); FEMS Microbiology Letters 180 (1999) 45-53; Virology 263, 376-387 (1999); y Virology 230, 361-368 (1997).

Extracción de lípidos e hidrocarburos

35 Los lípidos e hidrocarburos generados por los microorganismos de la presente invención pueden recuperarse mediante extracción con un disolvente orgánico. En algunos casos, el disolvente orgánico preferido es hexano. Normalmente, el disolvente orgánico se añade directamente al lisado sin separación previa de los componentes del lisado. En una realización, el lisado generado por uno o más de los métodos descritos anteriormente se pone en contacto con un disolvente orgánico durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los componentes de lípidos y/o hidrocarburos formen una disolución con el disolvente orgánico. En algunos casos, la disolución puede 40 luego refinarse para recuperar los componentes específicos de lípidos o hidrocarburos deseados. Los métodos de extracción con hexano se conocen bien en la técnica.

Métodos de procesamiento de lípidos e hidrocarburos

Modificación enzimática

45 Los hidrocarburos (por ejemplo, lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos) producidos por las células tal como se describe en el presente documento pueden modificarse mediante el uso de una o más enzimas, incluyendo una lipasa. Cuando los hidrocarburos están en el entorno extracelular de las células, pueden añadirse la una o más enzimas a ese ambiente en condiciones en las que la enzima modifica el hidrocarburo o completa su síntesis a partir de un precursor de hidrocarburo. Alternativamente, los hidrocarburos pueden aislarse parcial o completamente del 50 material celular antes de la adición de uno o más catalizadores, tales como enzimas. Tales catalizadores se añaden exógenamente, y su actividad se produce fuera de la célula o *in vitro*.

Modificación térmica u otra catalítica

Los hidrocarburos producidos por células *in vivo*, o modificados enzimáticamente *in vitro*, tal como se describe en el

presente documento, pueden procesarse opcionalmente de manera adicional por medios convencionales. El procesamiento puede incluir "craqueo" para reducir el tamaño y, por tanto, aumentar la razón de hidrógeno:carbono, de las moléculas de hidrocarburo. Los métodos de craqueo catalítico y térmico se usan habitualmente en el procesamiento de aceite de triglicéridos e hidrocarburos. Los métodos catalíticos implican el uso de un catalizador, tal como un catalizador de ácido sólido. El catalizador puede ser sílice-alúmina o una zeolita, que da como resultado la ruptura heterolítica o asimétrica de un enlace carbono-carbono para dar como resultado un carbocatión y un anión hidruro. Estos productos intermedios reactivos luego experimentan o bien reordenamiento o bien transferencia de hidruro con otro hidrocarburo. Las reacciones pueden, por tanto, regenerar los productos intermedios para dar como resultado un mecanismo de cadena autopropagante. Los hidrocarburos también pueden procesarse para reducir, opcionalmente a cero, el número de enlaces carbono-carbono dobles o triples en los mismos. Los hidrocarburos también pueden procesarse para retirar o eliminar un anillo o estructura cíclica en los mismos. Los hidrocarburos también pueden procesarse para aumentar la razón de hidrógeno:carbono. Esto puede incluir la adición de hidrógeno ("hidrogenación") y/o el "craqueo" de hidrocarburos en hidrocarburos más pequeños.

Los métodos térmicos implican el uso de temperaturas y presiones elevadas para reducir el tamaño de los hidrocarburos. Puede usarse una temperatura elevada de aproximadamente 800 C y una presión de aproximadamente 700 kPa. Estas condiciones generan "luz", un término que a veces se usa para referirse a moléculas de hidrocarburo ricas en hidrógeno (a diferencia del flujo de fotones), mientras que también genera, por condensación, moléculas de hidrocarburo más pesadas que están relativamente agotadas de hidrógeno. La metodología proporciona una ruptura homolítica o simétrica y produce alquenos, que pueden estar saturados enzimáticamente tal como se describió anteriormente.

Los métodos catalíticos y térmicos son convencionales en plantas para procesamiento de hidrocarburos y refinación de petróleo. Por tanto, los hidrocarburos producidos por las células tal como se describe en el presente documento pueden recogerse y procesarse o refinarse por medios convencionales. Véase Hillen *et al.* (Biotechnology and Bioengineering, vol. XXIV: 193-205 (1982)) para un informe sobre el hidrocraqueo 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 lípidos en biodiesel, se usa un proceso de transesterificación tal como se describe en la sección IV en el presente documento.

Los hidrocarburos producidos por medio de métodos de la presente invención son útiles en una variedad de aplicaciones industriales. Por ejemplo, la producción de sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS), un tensioactivo aniónico usado en casi todos los tipos de detergentes y preparaciones de limpieza, utiliza hidrocarburos que comprenden generalmente una cadena de 10-14 átomos de carbono. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 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. Pueden usarse tensioactivos, tales como LAS, en la fabricación de composiciones de cuidado personal y detergentes, tales como los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 5.942.479; 6.086.903; 5.833.999; 6.468.955; y 6.407.044.

Métodos de producción de combustibles adecuados para su uso en vehículos de diésel y motores de reacción

El interés creciente se dirige al uso de componentes de hidrocarburos de origen biológico en combustibles, tales como biodiésel, diésel renovable y carborreactor, ya que los materiales de partida biológicos renovables que pueden reemplazar a los materiales de partida derivados de combustibles fósiles están disponibles, y su uso es deseable. Hay una necesidad de métodos para producir componentes de hidrocarburos a partir de materiales biológicos. La presente invención satisface esta necesidad al proporcionar métodos para la producción de biodiésel, diésel renovable y carborreactor usando los lípidos generados por los métodos descritos en el presente documento como material biológico para producir biodiésel, diésel renovable y carborreactor.

Los combustibles diésel tradicionales son destilados de petróleo ricos en hidrocarburos parafínicos. Tienen intervalos de ebullición tan amplios como de 370 a 780 F, que son adecuados para la combustión en un motor de encendido por compresión, tal como un vehículo con motor diésel. La Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM) establece la calidad del diésel según el intervalo de ebullición, junto con los intervalos permisibles de otras propiedades del combustible, tales como número de cetano, punto de enturbiamiento, punto de inflamación, viscosidad, punto de anilina, contenido en azufre, contenido en agua, contenido en cenizas, corrosión de la tira de cobre y residuos de carbono. Técnicamente, cualquier material destilado de hidrocarburos derivado de biomasa o que de otro modo cumpla con la especificación adecuada de la ASTM puede definirse como combustible diésel (norma ASTM D975), carborreactor (norma ASTM D1655) o biodiésel (norma ASTM D6751).

Después de la extracción, los componentes de lípidos y/o hidrocarburos recuperados de la biomasa microbiana descritos en el presente documento pueden someterse a un tratamiento químico para fabricar un combustible para su uso en vehículos de diésel y motores a reacción.

Biodiésel

El biodiésel es un líquido que varía en color, entre marrón oscuro y dorado, según la materia prima de producción. Es prácticamente inmiscible con agua, tiene un alto punto de ebullición y baja presión de vapor. Biodiésel se refiere

a un combustible procesado equivalente al diésel para su uso en vehículos con motor diésel. El biodiésel es biodegradable y no tóxico. Un beneficio adicional del biodiésel con respecto al combustible diésel convencional es menor desgaste del motor.

- 5 Normalmente, el biodiésel comprende ésteres alquílicos C14-C18. Diversos procesos convierten la biomasa o un lípido producido y aislado tal como se describe en el presente documento en combustibles de diésel. Un método preferido para producir biodiésel es mediante transesterificación de un lípido tal como se describe en el presente documento. Un éster alquílico preferido para su uso como biodiésel es un éster metílico o éster etílico.

- 10 El biodiésel producido por un método descrito en el presente documento puede usarse solo o combinado con combustible diésel convencional a cualquier concentración en la mayoría de vehículos modernos con motor diésel. Cuando se combina con combustible diésel convencional (diésel de petróleo), el biodiésel puede estar presente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 99,9%. Gran parte del mundo usa un sistema conocido como factor "B" para indicar la cantidad de biodiésel en cualquier mezcla de combustible. Por ejemplo, el combustible que contiene el 20% de biodiésel se califica B20. El biodiésel puro se denomina B100.

- 15 El biodiésel también puede usarse como combustible de calefacción en calderas domésticas y comerciales. Las calderas a petróleo existentes pueden contener piezas de goma y pueden requerir conversión para funcionar con biodiésel. El proceso de conversión suele ser relativamente simple, ya que implica el intercambio de piezas de goma por piezas sintéticas debido a que el biodiésel es un disolvente fuerte. Debido a su fuerte poder disolvente, la combustión de biodiésel aumentará la eficacia de las calderas.

- 20 El biodiésel puede usarse como aditivo en formulaciones de diésel para aumentar la lubricidad de combustible diésel con contenido en azufre ultra bajo (ULSD) puro, lo que es ventajoso porque prácticamente no tiene contenido en azufre.

El biodiésel es un mejor disolvente que el petrodiesel y puede usarse para descomponer depósitos de residuos en las líneas de combustible de vehículos que han funcionado previamente con petrodiesel.

Producción de biodiésel

- 25 El biodiésel puede producirse por transesterificación de triglicéridos contenidos en biomasa rica en petróleo. Por tanto, en otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para producir biodiésel. En una realización preferida, el método para producir biodiésel comprende las etapas de (a) cultivar un microorganismo que contiene lípidos usando los métodos descritos en el presente documento (b) lisar un microorganismo que contiene lípidos para producir un lisado, (c) aislar el lípido del microorganismo lisado y (d) transesterificar la composición de lípidos, por lo que se produce biodiésel.

Los métodos para el crecimiento de un microorganismo, lisar un microorganismo para producir un lisado, tratar el lisado en un medio que comprende un disolvente orgánico para formar una mezcla heterogénea y separar el lisado tratado en una composición de lípidos se han descrito anteriormente y también pueden usarse en el método de producción de biodiésel.

- 35 Las composiciones lipídicas pueden someterse a transesterificación para producir ésteres de ácidos grasos de cadena larga útiles como biodiésel. Las reacciones de transesterificación preferidas se describen a continuación de manera resumida e incluyen la transesterificación catalizada por base y la transesterificación usando lipasas recombinantes.

- 40 En un proceso de transesterificación catalizada por base, los triacilglicéridos se hacen reaccionar con un alcohol, tal como metanol o etanol, en presencia de un catalizador alcalino, normalmente hidróxido de potasio. Esta reacción forma ésteres metílicos o etílicos y glicerina (glicerol) como subproducto.

Proceso químico general

- 45 Los aceites animales y vegetales están hechos normalmente de triglicéridos que son ésteres de ácidos grasos libres con el alcohol trihídrico, glicerol. En la transesterificación, el glicerol en un triacilglicérido (TAG) se reemplaza con un alcohol de cadena corta tal como metanol o etanol.

Uso de lipasas recombinante

- 50 La transesterificación también se ha llevado a cabo experimentalmente usando una enzima, tal como una lipasa en lugar de una base. La transesterificación catalizada por lipasa puede llevarse a cabo, por ejemplo, a una temperatura entre la temperatura ambiente y 80 °C, y una razón molar del TAG con respecto al alcohol inferior de más de 1:1, preferiblemente alrededor de 3:1.

Se encuentran lipasas adecuadas para su uso en transesterificación en, por ejemplo las patentes estadounidenses n.ºs 4.798.793; 4.940.845 5.156.963; 5.342.768; 5.776.741 y WO89/01032.

Un desafío al usar una lipasa para la producción de ésteres de ácidos grasos adecuados para el biodiésel es que el

precio de la lipasa es mucho más alto que el del hidróxido de sodio (NaOH) usado por el proceso de base fuerte. Este desafío se ha abordado mediante el uso de una lipasa inmovilizada, que puede reciclarse. Sin embargo, la actividad de la lipasa inmovilizada debe mantenerse después de reciclarse durante un número mínimo de ciclos para permitir que un proceso basado en lipasa compita con el proceso de base fuerte en cuanto al coste de producción.

5 Las lipasas inmovilizadas están sujetas a envenenamiento por los alcoholes inferiores usados normalmente en la transesterificación. La patente estadounidense n.º 6.398.707 (expedida el 4 de junio de 2002 a Wu *et al.*) describe métodos para potenciar la actividad de las lipasas inmovilizadas y regenerar las lipasas inmovilizadas que tienen actividad reducida.

En realizaciones particulares, se expresa una lipasa recombinante en los mismos microorganismos que producen el lípido sobre el que actúa la lipasa. El ADN que codifica para la lipasa y marcador seleccionable es preferiblemente ADNc optimizado por codones. Se describen métodos de recodificación de genes para expresión en microalgas en la patente estadounidense n.º 7.135.290.

Normas

La norma internacional común para biodiésel es EN 14214. La norma ASTM D6751 es la norma de biodiésel a la que se hace referencia más comúnmente en Estados Unidos y Canadá. Alemania usa la norma DIN EN 14214 y el RU requiere cumplimiento con la norma BS EN 14214.

Las pruebas industriales básicas para determinar si los productos cumplen con estas normas incluyen normalmente cromatografía de gases, HPLC y otros. El biodiésel que cumple con las normas de calidad es muy poco tóxico, con un índice de toxicidad (LD₅₀) de más de 50 ml/kg.

Diésel renovable

El diésel renovable comprende alcanos, tales como C16:0 y C18:0 y por tanto, son distinguibles del biodiésel. El diésel renovable de alta calidad cumple con la norma ASTM D975.

Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima para producir diésel renovable. Por tanto, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir diésel renovable. El diésel renovable puede producirse por al menos tres procesos: procesamiento hidrotérmico (hidrotratamiento); hidroprocesamiento; y licuefacción indirecta. Estos procesos producen destilados no éster. Durante estos procesos, los triacilglicéridos producidos y aislados tal como se describe en este documento, se convierten en alcanos.

En una realización preferida, el método para producir diésel renovable comprende (a) cultivar un microorganismo que contiene lípidos usando métodos dados a conocer en el presente documento (b) lisar el microorganismo para producir un lisado, (c) aislar el lípido del microorganismo lisado, y (d) desoxigenar e hidrotrear el lípido para producir un alcano, mediante lo cual se produce diésel renovable. Los lípidos adecuados para la fabricación de diésel renovable pueden obtenerse mediante extracción de biomasa microbiana usando un disolvente orgánico tal como hexano, o mediante otros métodos, tales como los que se describen en la patente estadounidense n.º 5.928.696.

En algunos métodos, el lípido microbiano se craquea en primer lugar junto con el hidrotratamiento para reducir la longitud de la cadena de carbono y saturar los enlaces dobles, respectivamente. El material se isomeriza luego, también en combinación con hidrotratamiento. Luego, la fracción de nafta puede eliminarse mediante destilación, seguida de destilación adicional para vaporizar y destilar los componentes deseados en el combustible diésel para cumplir con la norma D975, dejando componentes que son más pesados de lo deseado para cumplir con la norma D 975. Los métodos de hidrotratamiento, hidrocrackeo, desoxigenación e isomerización de aceites de modificación química, incluyendo aceites de triglicéridos, se conocen bien en la técnica. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente europea EP1741768 (A1); EP1741767 (A1); EP1682466 (A1); EP1640437 (A1); EP1681337 (A1); EP1795576 (A1); y las patentes estadounidenses n.ºs 7.238.277; 6.630.066; 6.596.155; 6.977.322; 7.041.866; 6.217.746; 5.885.440; 6.881.873.

Hidrotratamiento

En una realización preferida del método para producir diésel renovable, se realiza tratamiento del lípido para producir un alcano mediante hidrotratamiento de la composición de lípidos. En el procesamiento hidrotérmico, normalmente, se hace reaccionar biomasa en agua a una temperatura y presión elevadas para formar aceites y sólidos residuales. Las temperaturas de conversión son normalmente de 300 a 660 F, con presión suficiente para mantener el agua principalmente como un líquido, de 100 a 170 atmósfera convencional (atm). Los tiempos de reacción son del orden de 15 a 30 minutos. Después de que se complete la reacción, los compuestos orgánicos se separan del agua. De ese modo, se produce un destilado adecuado para diésel.

Hidroprocesamiento

Puede producirse un diésel renovable, denominado "diésel verde", a partir de ácidos grasos mediante tecnología de hidroprocesamiento tradicional. Los aceites que contienen triglicéridos pueden hidroprocesarse o bien como

coalimentación con petróleo o como alimentación dedicada. El producto es un combustible diésel que cumple con la especificación de la norma ASTM D975. Por tanto, en otra realización preferida del método para producir diésel renovable, se realiza tratamiento de la composición de lípidos para producir un alcano mediante hidroprocesamiento de la composición de lípidos.

- 5 En algunos métodos de fabricación de diésel renovable, la primera etapa de tratamiento de un triglicérido es hidroprocesamiento para saturar dobles enlaces, seguido por desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno y un catalizador. En algunos métodos, se produce hidrogenación y desoxigenación en la misma reacción. En otros métodos, se produce desoxigenación antes de hidrogenación. Se realiza entonces opcionalmente isomerización, también en presencia de hidrógeno y un catalizador. Los componentes de nafta se eliminan preferiblemente mediante destilación. Por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.475.160 (hidrogenación de triglicéridos); 5.091.116 (desoxigenación, hidrogenación y eliminación de gas); 6.391.815 (hidrogenación); y 5.888.947 (isomerización).

- 15 Las refinerías de petróleo usan hidroprocesamiento para eliminar impurezas tratando alimentaciones con hidrógeno. Las temperaturas de conversión de hidroprocesamiento son normalmente de 300 a 700 F. Las presiones son normalmente de 40 a 100 atm. Los tiempos de reacción son normalmente del orden de 10 a 60 minutos.

Se emplean catalizadores sólidos para aumentar determinadas velocidad de reacción, mejorar la selectividad para determinados productos y optimizar el consumo de hidrógeno.

- 20 El hidrotratamiento e hidroprocesamiento conducen en última instancia a una reducción en el peso molecular de la alimentación. En el caso de aceites que contienen triglicéridos, la molécula de triglicérido se reduce a cuatro moléculas de hidrocarburos en condiciones de hidroprocesamiento: una molécula de propano y tres moléculas de hidrocarburos más pesadas, normalmente en el intervalo de C8 a C18.

Licuefacción indirecta

- 25 Puede producirse un diésel con contenido en azufre ultra bajo tradicional a partir de cualquier forma de biomasa mediante un proceso de dos etapas. En primer lugar, la biomasa se convierte en un gas de síntesis, una mezcla gaseosa rica en hidrógeno y monóxido de carbono. Entonces, el gas de síntesis se convierte catalíticamente en líquidos. Normalmente, la producción de líquidos se realiza mediante la síntesis de Fischer-Tropsch (FT). Esta tecnología se aplica al carbón, gas natural y aceites pesados. Por tanto, en aún otra realización preferida del método para producir diésel renovable, el tratamiento de la composición de lípidos para producir un alcano se realiza mediante licuefacción indirecta de la composición de lípidos.

- 30 Carborreactor

- El combustible para aviones es de color transparente a color pajizo. El combustible más común es un combustible sin plomo/a base de aceite de parafina clasificado como avión A-1, que se produce según un conjunto de especificaciones estandarizadas internacionalmente. El combustible para aviones es una mezcla de una gran cantidad de hidrocarburos diferentes, posiblemente hasta mil o más. El intervalo de sus tamaños (pesos moleculares o números de carbono) está restringido por los requisitos del producto, por ejemplo, el punto de congelación o el punto de humeo. El combustible para aviones de tipo queroseno (incluyendo Jet A y Jet A-1) tiene una distribución de números de carbono entre aproximadamente 8 y 16 números de carbono. El combustible para aviones de alta volatilidad o tipo nafta (incluyendo Jet B) tiene normalmente una distribución de números de carbono entre aproximadamente 5 y 15 carbonos.

- 40 Ambos aviones (Jet A y Jet B) pueden contener varios aditivos. Los aditivos útiles incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, agentes antiestáticos, inhibidores de la corrosión y agentes inhibidores de la formación de hielo en el sistema de combustible (FSII). Los antioxidantes evitan el engomado y habitualmente, se basan en fenoles alquilados, por ejemplo, AO-30, AO-31 o AO-37. Los agentes antiestáticos disipan la electricidad estática y evitan las chipas. Stadis 450 con ácido dinonilnaftilsulfónico (DINNSA) como ingrediente activo es un ejemplo. Se usan inhibidores de la corrosión, por ejemplo, DCI-4A para combustibles civiles y militares y se usa DCI-6A para combustibles militares. Los agentes de FSII, incluyen, por ejemplo, Di-EGME.

- Una disolución es combinar combustibles de algas con carborreactor existente. La presente invención proporciona una disolución de este tipo. Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima para producir carborreactor. Por tanto, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir carborreactor. A continuación se proporcionan dos métodos para producir carborreactor a partir de los lípidos producidos por los métodos de la presente invención: craqueo catalítico en lecho fluidizado (FCC); e hidrodeshidrogenación (HDO).

Craqueo catalítico en lecho fluidizado

- 55 El craqueo catalítico en lecho fluidizado (FCC) es un método que se usa para producir olefinas, especialmente propileno a partir de fracciones de crudo pesado. Hay informes en la bibliografía de que podrían procesarse aceites vegetales tales como aceite de canola usando FCC para dar una corriente de hidrocarburos útil como combustible

de gasolina.

Los lípidos producidos por el método de la presente invención pueden convertirse en olefinas. El proceso implica hacer fluir los lípidos producidos a través de una zona de FCC y recoger una corriente de producto compuesta por olefinas, lo que es útil como carborreactor. Los lípidos producidos se ponen en contacto con un catalizador de craqueo en condiciones de craqueo para producir una corriente de producto que comprende olefinas e hidrocarburos útil como carborreactor.

En una realización preferida, el método para producir carborreactor comprende (a) cultivar un microorganismo que contiene lípidos usando métodos dados a conocer en el presente documento, (b) lisar el microorganismo que contiene lípidos para producir un lisado, (c) aislar lípidos del lisado, y (d) tratar la composición de lípidos, mediante lo cual se produce carborreactor.

En una realización preferida del método para producir un carborreactor, la composición de lípidos puede hacerse fluir a través de una zona de craqueo catalítico en lecho fluidizado, que, en una realización, puede comprender poner en contacto la composición de lípidos con un catalizador de craqueo en condiciones de craqueo para proporcionar una corriente de producto que comprende olefinas C₂-C₅.

En determinadas realizaciones de este método, puede ser deseable eliminar cualquier contaminante que pueda estar presente en la composición de lípidos. Por tanto, antes de hacer fluir la composición de lípidos a través de una zona de craqueo catalítico en lecho fluidizado, la composición de lípidos se trata previamente. El tratamiento previo puede implicar poner en contacto la composición de lípidos con una resina de intercambio iónico. La resina de intercambio iónico es una resina de intercambio iónico ácida, tal como Amberlyst™-15 y puede usarse como lecho en un reactor a través del cual se hace fluir la composición de lípidos, o bien en flujo ascendente o bien en flujo descendente. Otros tratamientos previos pueden incluir lavados de ácido suave poniendo en contacto la composición de lípidos con un ácido, tal como ácido sulfúrico, acético, nítrico o clorhídrico. La puesta en contacto se realiza con una disolución de ácido diluida habitualmente a temperatura ambiental y presión atmosférica.

La composición de lípidos, opcionalmente tratada previamente, se hace fluir a una zona de FCC en donde los componentes hidrocarbonados se craquean para dar olefinas. El craqueo catalítico se logra poniendo en contacto la composición de lípidos en una zona de reacción con un catalizador que se compone de material particulado finamente dividido. La reacción es craqueo catalítico, a diferencia de hidrocraqueo, y se lleva a cabo en ausencia de hidrógeno añadido o el consumo de hidrógeno. A medida que avanza la reacción de craqueo, se depositan cantidades sustanciales de coque sobre el catalizador. El catalizador se regenera a altas temperaturas quemando coque del catalizador en una zona de regeneración. El catalizador que contiene coque, denominado en el presente documento "catalizador coqueado", se transporta continuamente desde la zona de reacción hasta la zona de regeneración para regenerarse y reemplazarse por un catalizador regenerado esencialmente exento de coque de la zona de regeneración. La fluidización de las partículas de catalizador por diversas corrientes gaseosas permite el transporte de catalizador entre la zona de reacción y la zona de regeneración. Los expertos en la técnica de los procesos de FCC conocen bien los métodos para craquear hidrocarburos, tales como los de la composición de lípidos descrita en el presente documento, en una corriente de catalizador fluidizada, transportar el catalizador entre las zonas de reacción y regeneración y quemar el coque en el regenerador. Aplicaciones a modo de ejemplo de FCC y catalizadores útiles para craquear la composición de lípidos para producir olefinas C₂-C₅ se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 6.538.169, 7.288.685.

En una realización, el craqueo de la composición de lípidos de la presente invención, tiene lugar en la sección de columna ascendente o, alternativamente, la sección de elevación, de la zona de FCC. La composición de lípidos se introduce en la columna ascendente mediante una boquilla que da como resultado la rápida vaporización de la composición de lípidos. Antes de ponerse en contacto con el catalizador, la composición de lípidos tendrá normalmente una temperatura de aproximadamente 149 C a aproximadamente 316 C (de 300 F a 600 F). El catalizador se hace fluir desde un recipiente de combinación hasta la columna ascendente donde entra en contacto con la composición de lípidos durante un tiempo de aborto de 2 segundos o menos.

El catalizador combinado y los vapores de la composición de lípidos reaccionados se descargan entonces desde la parte superior de la columna ascendente a través de una salida y se separan en una corriente de vapor del producto craqueado incluyendo olefinas y una recogida de partículas de catalizador cubiertas con cantidades de coque sustanciales y se denomina generalmente "catalizador coqueado." En un esfuerzo por minimizar el tiempo de contacto de la composición de lípidos y el catalizador que puede promover la conversión adicional de productos deseados en otros productos indeseables, cualquier disposición de separadores, tal como una disposición de brazo de remolino, puede usarse para eliminar el catalizador coqueado de la corriente de producto rápidamente. El separador, por ejemplo, separador de brazo de remolino, se encuentra en una parte superior de una cámara con una zona de extracción situada en la parte inferior de la cámara. El catalizador separado por la disposición del brazo de remolino cae hacia la zona de extracción. La corriente de vapor del producto craqueado que comprende hidrocarburos craqueados que incluyen olefinas ligeras y algo de catalizador salen de la cámara a través de un conducto que está en comunicación con los ciclones. Los ciclones eliminan las partículas de catalizador restantes de la corriente de vapor del producto para reducir las concentraciones de partículas a niveles muy bajos. La corriente de vapor del producto luego 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 contacto contracorriente con vapor.

La baja presión parcial de hidrocarburos funciona para favorecer la producción de olefinas ligeras. Por consiguiente, la presión de la columna ascendente se ajusta a aproximadamente de 172 a 241 kPa (25 a 35 psia) con una presión parcial de hidrocarburo de aproximadamente 35 a 172 kPa (de 5 a 25 psia), con una presión parcial de hidrocarburo preferida de aproximadamente 69 a 138 kPa (de 10 a 20 psia). Esta presión parcial relativamente baja para el hidrocarburo se logra usando vapor como diluyente en la medida en que el diluyente es del 10 al 55% en peso de la composición de lípidos y, preferiblemente, aproximadamente el 15% en peso de la composición de lípidos. Pueden usarse otros diluyentes como gas seco para alcanzar presiones parciales de hidrocarburos equivalentes.

La temperatura de la corriente craqueada en la salida de la columna ascendente será de aproximadamente 510 C a 621 C (de 950 F a 1150 F). Sin embargo, las temperaturas de salida de la columna ascendente por encima de 566 C (1050 F) producen más gas seco y más olefinas. Considerando que, las temperaturas de salida de la columna ascendente por debajo de 566 C (1050 F) producen menos etileno y propileno. Por consiguiente, se prefiere ejecutar el proceso de FCC a una temperatura preferida de aproximadamente 566 C a aproximadamente 630 C, presión preferida de aproximadamente 138 kPa a aproximadamente 240 kPa (de 20 a 35 psia). Otra condición para el proceso es la razón de composición de lípidos con respecto a catalizador que puede variar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 y preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 15.

En una realización del método para producir un carborreactor, la composición de lípidos se introduce en la sección de elevación de un reactor de FCC. La temperatura en la sección de elevación estará muy caliente y oscilará entre aproximadamente 700 C (1292 F) y aproximadamente 760 C (1400 F) con una razón de composición de lípidos con respecto a catalizador de aproximadamente 100 a aproximadamente 150. Se anticipa que la introducción de la composición de lípidos en la sección de elevación producirá cantidades considerables de propileno y etileno.

Los productos de hidrocarburos líquidos y gaseosos producidos pueden analizarse por cromatografía de gases, HPLC, etc.

Hidrodesoxigenación

En otra realización del método para producir un carborreactor usando la composición de lípidos o los lípidos producidos tal como se describe en el presente documento, la estructura de la composición de lípidos o los lípidos se rompe mediante un proceso denominado hidrodesoxigenación (HDO).

HDO significa la eliminación de oxígeno por medio de hidrógeno, es decir, el oxígeno se elimina mientras se rompe la estructura del material. Los dobles enlaces olefínicos se hidrogenan y se elimina cualquier compuesto de azufre y nitrógeno. La eliminación de azufre se llama hidrodessulfuración (HDS). El tratamiento previo y la pureza de las materias primas (composición de lípidos o los lípidos) contribuyen a la vida útil del catalizador.

Generalmente, en la etapa de HDO/HDS, el hidrógeno se mezcla con la materia prima (composición de lípidos o los lípidos) y luego la mezcla se pasa a través de un lecho de catalizador como un flujo de cocorriente, o bien como una materia prima de una sola fase o bien de dos fases. Después de la etapa de 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 bibliografía (FI 100 248) como reactor de cocorriente.

El proceso para producir un combustible mediante la hidrogenación de una alimentación de hidrocarburos, por ejemplo, la composición de lípidos o los lípidos en el presente documento, también puede realizarse pasando la composición de lípidos o los lípidos como un flujo de cocorriente con gas hidrógeno a través de una primera zona de hidrogenación, y a continuación, el efluente de hidrocarburo se hidrogena adicionalmente en una segunda zona de hidrogenación pasando gas hidrógeno a la segunda zona de hidrogenación como un flujo a contracorriente en relación con el efluente de hidrocarburo. Aplicaciones y catalizadores de HDO a modo de ejemplo útiles para craquear la composición de lípidos para producir olefinas C₂-C₅ se describen en la patente estadounidense n.º 7.232.935.

Normalmente, en la etapa de hidrodesoxigenación, la estructura del componente biológico, tal como la composición de lípidos o lípidos en el presente documento, se descompone, los compuestos de oxígeno, nitrógeno, fósforo y 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 llamada etapa de isomerización, la isomerización se lleva a cabo para ramificar la cadena de hidrocarburo y mejorar el rendimiento de la parafina a bajas temperaturas.

En la primera etapa, es decir, la etapa HDO del proceso de craqueo, el gas hidrógeno y la composición de lípidos o lípidos en el presente documento que van a hidrogenarse se pasan a un sistema de lecho de catalizador de HDO o bien como flujos de cocorriente o bien contracorriente, comprendiendo dicho sistema de lecho de catalizador uno o más lechos de catalizador, preferiblemente 1-3 lechos de catalizador. La etapa de HDO se opera normalmente de manera cocorriente. En el caso de un sistema de lecho de catalizador HDO que comprende dos o más lechos de catalizador, uno o más de los lechos pueden operarse usando el principio de flujo a contracorriente.

En la etapa de HDO, la presión varía entre 20 y 150 bar, preferiblemente entre 50 y 100 bar, y la temperatura varía entre 200 y 500 C, preferiblemente en el intervalo de 300-400 C.

En la etapa de HDO, pueden usarse catalizadores de hidrogenación conocidos que contienen metales del grupo VII y/o VIB del sistema periódico. Preferiblemente, los catalizadores de hidrogenación están soportados por catalizadores de Pd, Pt, Ni, NiMo o CoMo, siendo el soporte alúmina y/o sílice. Normalmente, se usan catalizadores de NiMo/Al₂O₃ y CoMo/Al₂O₃.

Antes de la etapa de HDO, la composición de lípidos o los lípidos en el presente documento pueden tratarse opcionalmente por prehidrogenación en condiciones más suaves, evitando así las 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, preferiblemente 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. Preferiblemente, el catalizador de prehidrogenación es un catalizador soportado de Pd, Pt, Ni, NiMo o CoMo, siendo el soporte alúmina y/o sílice.

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

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 lo más completamente posible antes de que los hidrocarburos se pongan en contacto con el catalizador de isomerización. La etapa de isomerización comprende una etapa de extracción opcional, en la que el producto de reacción de la etapa de HDO puede purificarse mediante extracción con vapor de agua o un gas adecuado tal como hidrocarburo ligero, nitrógeno o hidrógeno. La etapa de extracción opcional se lleva a cabo a contracorriente en una unidad aguas arriba del catalizador de isomerización, en donde el gas y el líquido se ponen en contacto entre sí, o antes del reactor de isomerización real en una unidad de extracción independiente que utiliza el principio de contracorriente.

Después de la etapa de extracción, el gas hidrógeno y los lípidos o composición de lípidos hidrogenados en el presente documento, y opcionalmente una mezcla de n-parafina, se pasan a una unidad de isomerización reactiva que comprende uno o varios lechos de catalizador. Los lechos de catalizador de la etapa de isomerización pueden operar o bien a cocrriente o bien a contracorriente.

Es importante para el proceso que el principio de flujo a contracorriente se aplique en la etapa de isomerización. En la etapa de isomerización, esto se realiza llevando a cabo o bien la etapa de extracción opcional o bien la etapa de reacción de isomerización o ambas a contracorriente.

La etapa de isomerización y la etapa de HDO pueden llevarse a cabo en el mismo recipiente a presión o en recipientes a presión separados. La prehidrogenación opcional puede llevarse a cabo en un recipiente de presión separado o en el mismo recipiente de presión que las etapas de HDO e isomerización.

En la etapa de isomerización, la presión varía en el intervalo de 20 150 bar, preferiblemente en el intervalo de 20 100 bar, estando la temperatura entre 200 y 500 C, preferiblemente entre 300 y 400 C.

En la etapa de isomerización, pueden usarse catalizadores de isomerización conocidos en la técnica. Los catalizadores de isomerización adecuados contienen un tamiz molecular y/o un metal del grupo VII y/o un portador. Preferiblemente, el catalizador de isomerización contiene SAPO-11 o SAPO41 o ZSM-22 o ZSM-23 o ferrierita y Pt, Pd o Ni y Al₂O₃ o SiO₂. Los catalizadores de isomerización típicos son, por ejemplo, Pt/SAPO-11/Al₂O₃, Pt/ZSM-22/Al₂O₃, Pt/ZSM-23/Al₂O₃ y Pt/SAPO-11/SiO₂.

Como producto, se obtiene un componente de hidrocarburos de alta calidad de origen biológico, útil como combustible diésel o componente del mismo, siendo excelente la densidad, el índice de cetano y el rendimiento a baja temperatura de dicho componente de hidrocarburos.

Modificación por ingeniería genética de microbios

Tal como se indicó anteriormente, en determinadas realizaciones de la presente invención es deseable modificar genéticamente un microorganismo para potenciar la producción de lípidos, modificar las propiedades o proporciones de componentes generados por el microorganismo, o para mejorar o proporcionar características de crecimiento *de novo* en una variedad de materiales de materia prima.

Pueden generarse promotores, ADNc y 3'UTR, así como otros elementos de los vectores, mediante técnicas de clonación usando fragmentos aislados de fuentes nativas (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al.* (3ª edición, 2001, Cold Spring Harbor Press; y patente estadounidense n.º 4.683.202). Alternativamente, pueden generarse elementos sintéticamente usando métodos conocidos (véase, por ejemplo,

Gene. 16 de octubre de 1995; 164(1):49-53). Los métodos de modificación por ingeniería genética microbianos se conocen generalmente en la técnica, por ejemplo, solicitud de patente estadounidense n.º 20090011480.

Ejemplos

A continuación se muestran ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, deben permitirse algunos errores y desviaciones experimentales.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, farmacología y técnicas de ADN recombinante, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman y Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., adición actual); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey y Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3ª ed. (Plenum Press) vol. A y B (1992).

Ejemplo 1: Aumento de biomasa mediante aplicación de iluminación de baja intensidad a fermentación de microalgas.

Botryococcus sintetiza y tolera de manera natural mezclas de hidrocarburos y produce hasta un 85% de hidrocarburo en peso, y en muchos casos el hidrocarburo principal es botriococceno. También se sabe que es un fototrófo obligado, pero parece tener la capacidad de captar glucosa (referencia: "Biosynthesis of the triterpenoids, botryococcenes and tetrametilsqualene in the B race of *Botryococcus braunii* via the non-mevalonate pathway" Sato *et al.* 2003. *Tetrahedron Letter* 44:7035-7037).

Se hace crecer cultivo de *Botryococcus* sobre medios BG11 (referencia: "Autotrophic cultivation of *Botryococcus* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media". Dayananda *et al.* 2007. *Biomass and Bioenergy*. 31: 87-93) a 25-35°C en un biorreactor con el 10-30% de oxígeno disuelto. Se someten a prueba los efectos de la señal luminosa sobre el crecimiento heterótrofo de *Botryococcus* comparando el peso seco celular de los cultivos de diferentes condiciones (oscuridad+sin glucosa, oscuridad+glucosa, luz+sin glucosa y luz+ glucosa). Se somete a prueba la intensidad de luz óptima (0,01-300 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y diferentes espectros de luz (360-700 nm) así como diferentes periodos de luz (9-16 h). La combinación de baja irradiancia de luz y glucosa da como resultado a) velocidad de crecimiento mejorada, b) productos aumentados tales como carotenoides, lípidos y botriococcenos.

Ejemplo 2: Regulación luminosa de ruta de isoprenoides.

Algunas plantas y especies de microalgas sintetizan y emiten isopreno, monoterpenos y sesquiterpenos, pero no todas las especies tienen esta capacidad. Estos compuestos isoprenoides no esenciales volátiles comparten los mismos precursores bioquímicos como isoprenoides más grandes comercialmente útiles tales como carotenoides e hidrocarburos. Dos rutas separadas operan en células vegetales para sintetizar precursores de difosfato de prenilo común a todos los isoprenoides.

Se producen precursores citosólicos y mitocondriales por la ruta de ácido mevalónico (MVA) mientras que la ruta de fosfato de metileritritol recientemente descubierta (MEP) se ubica en plástidos. *Botryococcus braunii* produce hidrocarburo por la ruta de MEP no mevalónica (figura 2).

La luz es el factor ambiental más importante para la regulación de la ruta de MEP. 1-Desoxi-d-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR) es la etapa limitante de la velocidad, y la expresión del gen que codifica para DXR está regulada por la luz (referencia: "Expression and molecular analysis of the Arabidopsis DXR gene encoding 1-deoxy-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway". Carretero-Paulet *et al.* *Plant Physiology*. 2002. 129:1581-1591).

Otro ejemplo es la activación por luz azul de genes que codifican para enzimas biosintéticas de carotenoides en *Chlamydomonas reinhardtii*, un alga verde unicelular. Los experimentos de PCR cuantitativa y microalineamiento mostraron que los genes que codifican para enzimas biosintéticas de carotenoides tales como PDS, HDS, PSY y ZDS se activan por irradiancia muy baja de luz blanca (0,01 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y luz azul. Pruebas adicionales sugirieron que la fototropina, un receptor de luz azul, está implicado en la expresión de genes activados por luz azul para la biosíntesis de carotenoides (referencia: "Fototropin involvement in the expression of genes encoding chlorophyll and carotenoid biosynthesis enzymes and LHC apoproteins in *Chlamydomonas reinhardtii*". Im *et al.* *The Plant Journal*. 2006. 48:1-16).

Un ejemplo es el aumento de producción de hidrocarburos de *Botryococcus*. Se aplican diversas intensidades de luz (0,01-300 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y diferentes espectros de luz (360-700 nm) a un cultivo de *Botryococcus*, y la

cantidad de diferentes especies de hidrocarburos se mide mediante CG-EM.

Ejemplo 3. Crecimiento de *Neochloris oleabundans* en diferentes condiciones de luz

Materiales y métodos

Microalgas y condición de cultivo

- 5 Se obtuvo la cepa de *Neochloris oleabundans* UTEX 1185 de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX EE.UU.). Se hizo crecer el cultivo inicial de las microalgas en un matraz de Erlenmyer de 250 ml que contenía 120 ml de medio de Bold 3 N modificado con glucosa al 2% a temperatura ambiente a 25°C con una lámina de aluminio que cubría ligeramente el matraz en un agitador orbital a 130 rpm bajo alternando dos bombillas fluorescentes de luz solar natural de 40W (392316, Philips) y dos bombillas fluorescentes de planta y acuario de 40W (392282, Philips). El medio de cultivo (MB3N modificado) contenía los siguiente componentes por 1 l de agua desionizada: 0,75 g de NaNO₃, 0,075 g de K₂HPO₄, 0,074 g de MgSO₄ 7H₂O, 0,025 g de CaCl₂ 2H₂O, 0,176 g de KH₂PO₄, 0,025 g de NaCl, 6 ml de disolución metálica P-IV (0,75 g de Na₂EDTA 2H₂O, 0,097g de FeCl₃ 6H₂O, 0,041g de MnCl₂ 4H₂O, 0,005 g de ZnCl₂, 0,002 g de CoCl₂ 6H₂O, 0,004 g de Na₂MoO₄ 2H₂O en 1 l agua desionizada), 1 ml de cada una de tres vitaminas (vitamina B12 0,1 mM, biotina 0,1 mM, tiamina 6,5 mM disuelta por separado en HEPES 50 mM pH7,8). Se ajustó el pH final del medio a 7,5 con KOH al 20% antes de someter el medio a autoclave. Se añadieron disoluciones de vitaminas para enfriar el medio sometido a autoclave. Una vez que el cultivo inicial alcanzó determinada confluencia, se midió su concentración usando densidad óptica (DO) a 680 nm y 750 nm usando el espectrofotómetro Genesys 10 UV (Thermo Scientific).

Procedimiento experimental y medición del crecimiento

- 20 Se sometieron a prueba tres longitudes de onda de luz diferentes (blanca, azul y roja). Se adquirieron luces LED de Super Bright LEDs, Inc. (blanca: RL5-W3030, azul: RL5- B2430, roja: RL5-R1330). Para cada longitud de onda de luz, se configuraron cuatro condiciones diferentes por duplicado tal como sigue:

1-2. MB3N modificado + sin glucosa + oscuridad

3-4. MB3N modificado + sin glucosa + luz tenue

- 25 5-6. MB3N modificado + glucosa al 2% + oscuridad

7-8. MB3N modificado + glucosa al 2% + luz tenue

- Se preparó un total de ocho matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contenían un volumen final de 120 ml de cultivo celular con una concentración celular inicial de DO 0,1 a 750 nm ($\sim 1,1 \times 10^6$ células/ml) para cada condición. Se ajustó la intensidad de luz a 3-4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ fotones para la luz blanca, 2-3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ fotones para la luz azul y 1-2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ fotones para la luz roja. Se ajustó la velocidad del agitador orbital a 135 rpm. Se llevó a cabo el experimento a temperatura ambiente durante dos semanas. Se obtuvo 1 ml de cultivo celular de cada matraz cada 24 h para evaluar las concentraciones celulares midiendo la DO a 680 nm y 750 nm usando el espectrofotómetro Genesys 10 UV de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA EE.UU.). Se determinó la velocidad de crecimiento específica representando el logaritmo de la densidad óptica de cultivo frente al tiempo (figura 3). La combinación de una baja irradiancia de luz roja, blanca o azul y glucosa, dio como resultado una velocidad de crecimiento mejorada en comparación con los controles.

Ejemplo 4. Crecimiento de *Botryococcus sudeticus* en diferentes condiciones de luz

Materiales y métodos

Cepas y medios

- 40 Se obtuvo la cepa de *Botryococcus sudeticus* UTEX 2629 de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX EE.UU.). Se hizo crecer cultivo de reserva en matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contenían 120 ml de medio BG11 modificado con glucosa al 2% a temperatura ambiente a 25°C con luz tenue (4-5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ fotones) en un agitador orbital a 130 rpm. La iluminación tenue se compone de dos bombillas diferentes, bombillas fluorescentes de luz solar natural de 40 W (392316 Philips) y bombillas fluorescentes de planta y acuario de 40W (392282 Philips). 1 l de medio de cultivo (BG-11 modificado) contenía: HEPES 10 mM (pH 7,8), 1,5 g de NaNO₃, 0,04 g de K₂HPO₄, 0,06 g de MgSO₄ 7H₂O, 0,036 g de CaCl₂ 2H₂O, 0,006 g de ácido cítrico H₂O, 0,0138 g de citrato férrico de amonio, 0,001 g de Na₂EDTA 2H₂O, 0,02 g de Na₂CO₃, 2,86 mg de H₃BO₃, 1,81 mg de MnCl₂ 4H₂O, 0,2 mg de ZnSO₄ 7H₂O, 0,39 mg de Na₂MoO₄ 2H₂O, 0,079 mg de CuSO₄ 5H₂O, 0,0494 mg de Co(NO₃)₂ 6H₂O, 0,5 g de hidrolizado de caseína y 1 ml de cada una de tres vitaminas (vitamina B12 0,1 mM, biotina 0,1 mM, tiamina 6,5 mM disuelta por separado en HEPES 50 mM pH7,8). Se ajustó el pH final del medio a 7,8 con KOH al 20%.

Procedimiento experimental y medición del crecimiento

Se sometieron a prueba tres longitudes de onda de luz diferentes (blanca, azul y roja). Se adquirieron luces LED de

Super Bright LEDs, Inc. (blanca: RL5-W3030, azul: RL5-B2430, roja: RL5-R1330). Para cada longitud de onda de luz, se configuraron cuatro condiciones diferentes por duplicado tal como sigue:

1-2. BG-11 modificado + sin glucosa + oscuridad

3-4. BG-11 modificado + sin glucosa + luz tenue

5 5-6. BG-11 modificado + glucosa al 2% + oscuridad

7-8. BG-11 modificado + glucosa al 2% + luz tenue

Se prepararon un total de ocho matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contenían un volumen final de 120 ml de cultivo celular con una concentración celular inicial de DO 0,1 a 750 nm ($\sim 1,1 \times 10^6$ células/ml) para cada condición. Se ajustó la intensidad de luz a $3-4 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ fotones para la luz blanca, $2-3 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ fotones para la luz azul y $1-2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ fotones para la luz roja. Se ajustó la velocidad del agitador orbital a 135 rpm. Se llevó a cabo el experimento a temperatura ambiente durante dos semanas. Se obtuvo 1 ml de cultivos celulares de cada matraz cada día para evaluar concentraciones celulares midiendo la DO a 680 nm y 750 nm usando el espectrofotómetro Genesys 10 UV de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA EE.UU.). Se determinó la velocidad de crecimiento específica representando el logaritmo la densidad óptica de cultivo frente al tiempo (figura 4). La combinación de una baja irradiancia de luz roja, blanca o azul y glucosa, dio como resultado una velocidad de crecimiento mejorada en comparación con los controles.

Ejemplo 5: *Botryococcus braunii*: Fermentación con iluminación controlada

Materiales y métodos

Cepas y medios

20 Se obtuvo la cepa de *Botryococcus braunii* UTEX 2441 de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX EE.UU.). Se hizo crecer cultivo de reserva en matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contenían 120 ml de medio BG11 modificado con glucosa al 2% a temperatura ambiente a 25°C con luz tenue ($4-5 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ fotones) en un agitador orbital a 130 rpm. La iluminación tenue se componía de dos bombillas diferentes, bombillas fluorescentes de luz solar natural de 40 W (392316 Philips) y bombillas fluorescentes de planta y acuario de 40W (392282 Philips). 1 l de medio de cultivo (BG- 11 modificado) contenía: HEPES 10 mM (pH 7,8), 1,5 g de NaNO_3 , 0,04 g de K_2HPO_4 , 0,06 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,036 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,006 g de ácido cítrico H_2O , 0,0138 g de citrato férrico de amonio, 0,001 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de Na_2CO_3 , 2,86 mg de H_3BO_3 , 1,81 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,22 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,39 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,079 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0494 mg de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de hidrolizado de caseína y 1 ml de cada una de tres vitaminas (vitamina B12 0,1 mM, biotina 0,1 mM, tiamina 6,5 mM disuelta por separado en HEPES 50 mM pH7,8). Se ajustó el pH final del medio a 7,8 con KOH al 20%.

Procedimiento experimental y medición del crecimiento

Se sometieron a prueba tres longitudes de onda de luz diferentes (blanca, azul y roja). Se adquirieron luces LED de Super Bright LEDs, Inc. (blanca: RL5-W3030, azul: RL5-B2430, roja: RL5-R1330). Para cada longitud de onda de luz, se configuraron cuatro condiciones diferentes por duplicado tal como sigue:

35 1-2 BG-11 modificado + sin glucosa + oscuridad

3-4 BG-11 modificado + sin glucosa + luz tenue

5-6 BG-11 modificado + glucosa al 2% + oscuridad

7-8 BG-11 modificado + glucosa al 2% + luz tenue

40 Se preparó un total de ocho matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contenían un volumen final de 120 ml de cultivo celular con una concentración celular inicial de DO 0,1 a 750 nm ($\sim 1,1 \times 10^6$ células/ml) para cada condición. Se ajustó la intensidad de luz a $3-4 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ fotones para la luz blanca, $2-3 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ fotones para la luz azul y $1-2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ fotones para la luz roja. Se ajustó la velocidad del agitador orbital a 150 rpm. Se llevó a cabo el experimento a temperatura ambiente durante dos semanas. Se obtuvieron 5 ml de cada cultivo celular de cada matraz cada dos días para evaluar el crecimiento celular en peso celular seco (DCW). Se determinó la velocidad de crecimiento específica representando el DCW de cultivo frente al tiempo (figura 5).

Medición de fluorescencia de lípidos neutros usando rojo Nilo

50 En 1 ml de suspensión de algas, se añadieron 4 μl de disolución de rojo Nilo en acetona (250 $\mu\text{g/ml}$). Se agitó con vórtex la mezcla 2 veces durante una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se transfirieron 200 μl de muestras de algas teñidas en pocillos individuales en una placa de 96 pocillos. Se midió la fluorescencia en un espectrofluorómetro de placa de 96 pocillos de Molecular Devices con una excitación a 490 nm y longitud de onda de emisión a 585 nm con corte de filtro de 530 emisiones. Con el fin de determinar la intensidad de

fluorescencia relativa de muestras de algas, se restó el blanco (rojo Nilo solo en el medio) de la intensidad de fluorescencia.

Resultados

- 5 Luz roja + glucosa aumentó la tasa de crecimiento de UTEX 2441 en un 35% en comparación con el cultivo heterótrofo en la oscuridad (oscuridad+glu) (figura 5). Los niveles de lípidos también aumentaron en un 52% en condiciones de luz roja en comparación con los controles (figura 6).

Ejemplo 6: *Chlamydomonas reinhardtii*: Fermentación con iluminación controlada

Materiales y métodos

Cepas y medios

- 10 Se obtuvo la cepa de *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 2243 de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX EE.UU.). Se hicieron crecer cultivos de reserva por separado en matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contenían 120 ml de medio TAP a temperatura ambiente a 25°C con luz tenue (4-5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ fotones) en un agitador orbital a 130 rpm. La iluminación tenue se componía de dos bombillas diferentes (bombillas fluorescentes de luz solar natural de 40 W (392316 Philips) y bombillas fluorescentes de planta y acuario de 40W (392282 Philips)). 1 l de medio de cultivo (TAP) contenía: 2,42 g de Tris, 25 ml de disolución salina de TAP (15 g de NH_4Cl , 4 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,375 ml de disolución de fosfato (28,8 g de K_2HPO_4 , 14,4 g de KH_2PO_4 en 100 ml de agua), 1 ml de disolución de elementos traza de Hutner (1 l de disolución de metales traza contiene 50 g de sal de disodio EDTA, 22 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11,4 g de H_3BO_3 , 5,06 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,61 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,57 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,10 $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4,99 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con pH 7,0 usando o bien KOH o bien HCl) y 1 ml de ácido acético glacial. El pH final del medio es 7,0 ajustado con ácido acético glacial. Se realizó medio mínimo de Tris (TP) con todos los componentes indicados anteriormente excepto ácido acético. Se ajustó el pH del medio a 7,0 con HCl.
- 15
- 20

Procedimiento experimental y medición del crecimiento

- 25 Se adquirieron luces LED de Super Bright LEDs, Inc. (RL5-W3030). Se configuraron cuatro condiciones diferentes por duplicado tal como sigue:
- 1-2. TP (sin ácido acético) + oscuridad
- 3-4. TP (sin ácido acético) + luz tenue
- 5-6. TAP (ácido acético) + oscuridad
- 7-8. TAP (ácido acético) + luz tenue
- 30 Se preparó un total de ocho matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contenían un volumen final de 120 ml de cultivo celular con una concentración celular inicial de $1,0 \times 10^5$ células/ml para cada condición. Se ajustó la intensidad de luz a 3-5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ fotones. Se ajustó la velocidad del agitador orbital a 140 rpm. Se llevó a cabo el experimento a temperatura ambiente durante una semana. Se obtuvieron 500 μl de cultivo celular de cada matraz cada día para evaluar el crecimiento celular contando los números de células. Se desflagelaron las células usando disolución de lugol (1:20) antes del recuento. Se determinó la velocidad de crecimiento específica representando el número de células frente al tiempo. La combinación de una baja irradiancia de luz blanca y TAP dio como resultado una velocidad de crecimiento mejorada en comparación con los controles (figura 7).
- 35

Ejemplo 7: Cultivo de microalgas con una baja irradiancia de luz

Materiales y métodos

Cepas y medios

- 40 Se obtienen cepas de microalgas (por ejemplo, *Chlamydomonas*, *Botryococcus*, *Neochloris*, Cyanophyta, Chlorophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Chlorarachniophyta, Haptophyta, Euglenophyta, Heterokontophyta, Diatomea y/o las descritas en la descripción anterior) de, por ejemplo, la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, TX EE.UU.). Se hace crecer cultivo de reserva, por ejemplo, en matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contienen el medio apropiado (véanse, por ejemplo, las instrucciones del fabricante) a aproximadamente temperatura ambiente de 25°C con luz tenue (por ejemplo, 4-5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ fotones) en un agitador orbital a aproximadamente 130 rpm. Se usa una fuente de carbono apropiada en los medios de cultivo, por ejemplo, glucosa. La iluminación tenue puede componerse de dos bombillas diferentes, por ejemplo, bombillas fluorescentes de luz solar natural de 40 W (392316 Philips) y bombillas fluorescentes de planta y acuario de 40W (392282 Philips).
- 45
- 50 Se ajusta el pH final del medio según sea apropiado para la cepa particular. Véanse, por ejemplo, las instrucciones del fabricante.

Procedimiento experimental y medición del crecimiento

Se someten a prueba tres longitudes de onda de luz diferentes (blanca, azul y roja). Se adquieren luces LED de, por ejemplo, Super Bright LEDs, Inc. (blanca: RL5-W3030, azul: RL5- B2430, roja: RL5-R1330). Para cada longitud de onda de luz, se configuran cuatro condiciones diferentes por duplicado tal como sigue:

5 1-2 sin carbono + oscuridad

3-4 sin carbono + luz tenue

5-6 carbono + oscuridad

7-8 carbono + luz tenue

10 Se prepara un total de ocho matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contienen un volumen final de 120 ml de cultivo celular con una concentración celular inicial de, por ejemplo, $DO\ 0,1$ a $750\ nm$ ($\sim 1,1 \times 10^6$ células/ml) para cada condición. Se someten a prueba la intensidad de luz óptima (por ejemplo, $0,01-300\ \mu mol$ de fotones $m^{-2}\ s^{-1}$) y diferentes espectros de luz (por ejemplo, $360-700\ nm$) así como diferente periodos de luz (por ejemplo, $9-16\ h$ de luz). Se ajusta la intensidad de luz a, por ejemplo, $3-4\ \mu mol/m^2s^{-1}$ fotones para la luz blanca, $2-3\ \mu mol/m^2s^{-1}$ fotones para la luz azul y $1-2\ \mu mol/m^2s^{-1}$ fotones para la luz roja. Se someten a prueba diversas fuentes de carbono a diversas concentraciones, por ejemplo, glucosa, sacarosa, fructosa a una concentración de, por ejemplo, el 1%, el 2% o el 3% de medios de cultivo. Se ajusta la velocidad del agitador orbital a, por ejemplo, $150\ rpm$. Se lleva a cabo el experimento a temperatura ambiente durante menos de una, una, dos, tres o más semanas. Se obtiene una alícuota de cada cultivo celular de cada matraz cada uno a dos días para evaluar el crecimiento celular mediante, por ejemplo, el peso celular seco (DCW). La velocidad de crecimiento específica se determina representando el DCW de cultivo frente al tiempo.

15

20

Medición del material de interés

Se mide la cantidad de material de interés (hidrocarburo, lípido, etc.) en los medios usando medios convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, CG-EM o rojo Nilo tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, en $1\ ml$ de suspensión de algas, se añaden $4\ ul$ de disolución de rojo Nilo en acetona ($250\ ug/ml$). Se agita con vórtex la mezcla durante la incubación a temperatura ambiente. Tras la incubación, se transfieren $100-200\ ul$ de muestras de algas teñidas en pocillos individuales en una placa de 96 pocillos. Se mide la fluorescencia en, por ejemplo, un espectrofluorómetro de placa de 96 pocillos de Molecular Devices con una excitación a $490\ nm$ y longitud de onda de emisión a $585\ nm$ con corte de filtro de 530 emisiones. Con el fin de determinar la intensidad de fluorescencia relativa de muestras de algas, se resta el blanco (rojo Nilo solo en el medio) de la intensidad de fluorescencia.

25

Resultados

La luz roja, blanca y/o luz azul en combinación con una fuente de carbono aumentan la tasa de crecimiento de la cepa de microalgas en comparación con los controles. Los niveles de material de interés (por ejemplo, hidrocarburo o lípido) producidos por la cepa de microalgas experimental (luz roja, blanca y/o azul en combinación con una fuente de carbono) aumentan en comparación con los controles.

30

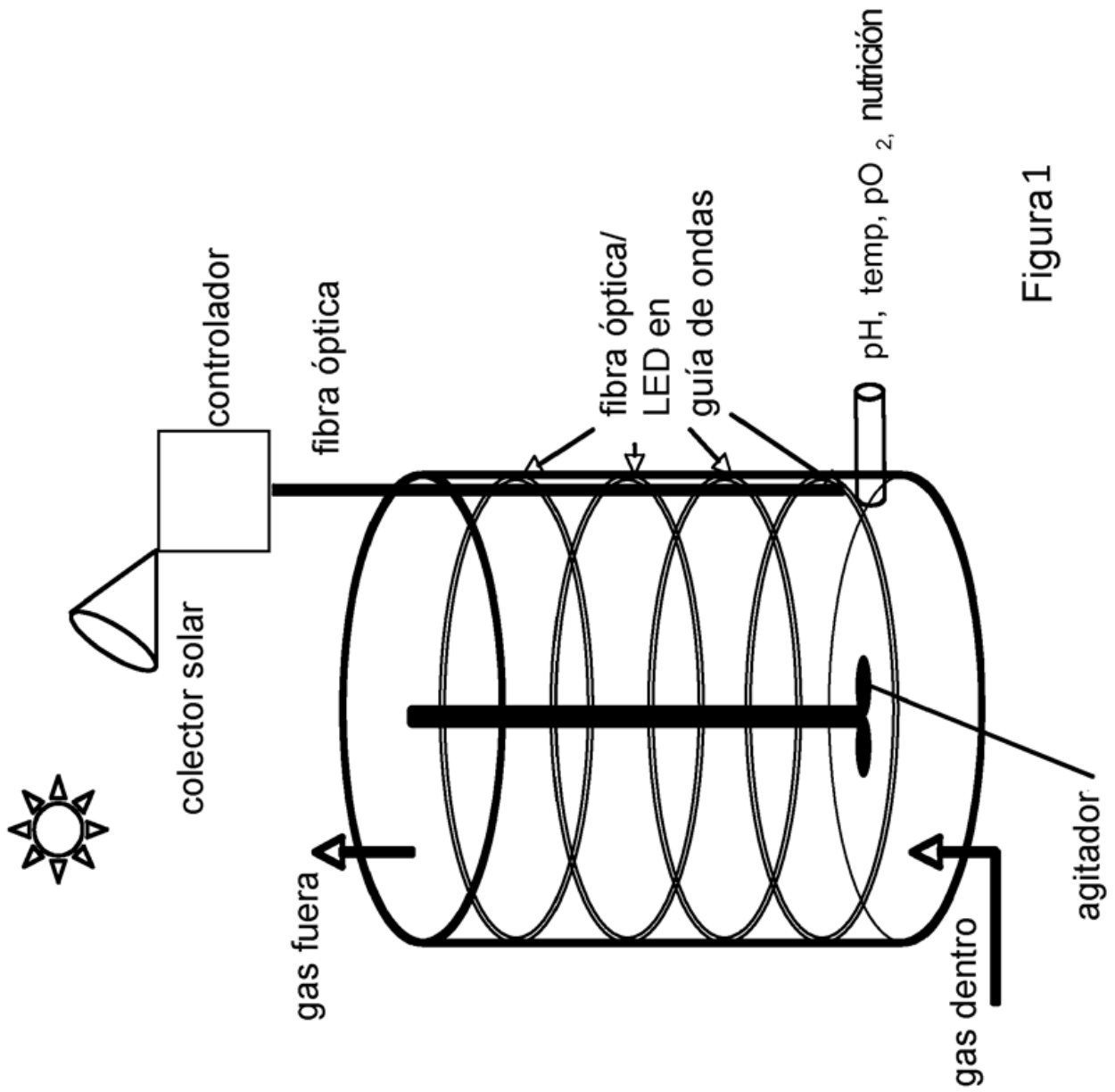
35

REIVINDICACIONES

1. Método para cultivar una microalga capaz de crecimiento heterótrofo, que comprende: incubar la microalga en una condición de crecimiento heterótrofo durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que crezca la microalga,
5 en el que la microalga es una cepa de *Botryococcus*, una cepa de *Neochloris* o cepa de *Chlamydomonas*,
en el que la condición de crecimiento heterótrofo comprende un medio que comprende una fuente de carbono fija, y
en el que la condición de crecimiento heterótrofo comprende además una irradiancia de una luz blanca de 3-4 μmol de fotones/ m^2s , luz azul de 2-3 μmol de fotones/ m^2s y/o luz roja de 1-2 μmol de fotones/ m^2s .
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la microalga es una cepa de *Botryococcus sudeticus*, una cepa UTEX 2629, una cepa de *Botryococcus braunii*, una cepa UTEX 2441, una cepa de *Neochloris oleabundans*, una cepa UTEX 1185, una cepa de *Chlamydomonas reinhardtii*, una cepa UTEX 2243, o una cepa que comprende un fotorreceptor.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la microalga es una cepa UTEX 2629 o una cepa UTEX 2441.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, en el que la fuente de carbono es glucosa.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en una fuente de carbono fija, glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, xilosa, manosa, ramnosa, N-acetilglucosamina, glicerol, floridósido, ácido glucurónico, almidón de maíz, material celulósico despolimerizado, caña de azúcar, remolacha azucarera, lactosa, suero de leche y melaza.
- 20 6. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la luz se produce mediante una fuente de luz natural, la luz es luz solar natural, la luz comprende luz de espectro completo o una longitud de onda de luz específica, la luz se produce mediante una fuente de luz artificial, o la luz es luz artificial.
7. Método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además producir un material a partir de la microalga.
- 25 8. Método según la reivindicación 7, en el que el material es un polisacárido, un pigmento, un lípido o un hidrocarburo.
9. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que el material es un hidrocarburo, o que comprende además recuperar el material, y opcionalmente que comprende además procesar el material; o que comprende además extraer el material; o
- 30 que comprende además procesar el material y opcionalmente en el que el procesamiento del material produce un material procesado.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el material procesado se selecciona del grupo que consiste en un combustible, biodiésel, carborreactor, un cosmético, un agente farmacéutico, un tensioactivo y un diésel renovable.
- 35 11. Método de fabricación de un material seleccionado de un lípido y un hidrocarburo, que comprende:
proporcionar una microalga capaz de producir el material, en el que la microalga es una cepa de *Botryococcus*, una cepa de *Neochloris* o una cepa de *Chlamydomonas*;
cultivar la microalga en un medio en una condición de crecimiento heterótrofo durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que crezca la microalga, en el que el medio comprende una fuente de carbono fija;
40 aplicar una irradiancia de una luz blanca de 3-4 μmol de fotones/ m^2s , luz azul de 2-3 μmol de fotones/ m^2s y/o luz roja de 1-2 μmol de fotones/ m^2s a la microalga; y
permitir que la microalga acumule al menos el 10% de su peso celular seco como material.
12. Sistema de biorreactor, que comprende:
un biorreactor;
45 un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono fija, en el que el medio de cultivo se sitúa dentro del biorreactor;
una microalga adaptada para crecimiento heterótrofo, en el que la microalga se sitúa en los medios de

cultivo y es una cepa de *Botryococcus*, una cepa de *Neochloris* o una cepa de *Chlamydomonas*; y

una fuente de luz, en el que la fuente de luz produce una irradiancia de una luz blanca de 3-4 μmol de fotones/ m^2s , luz azul de 2-3 μmol de fotones/ m^2s y/o luz roja de 1-2 μmol de fotones/ m^2s , y en el que la fuente de luz se acopla operativamente al biorreactor.



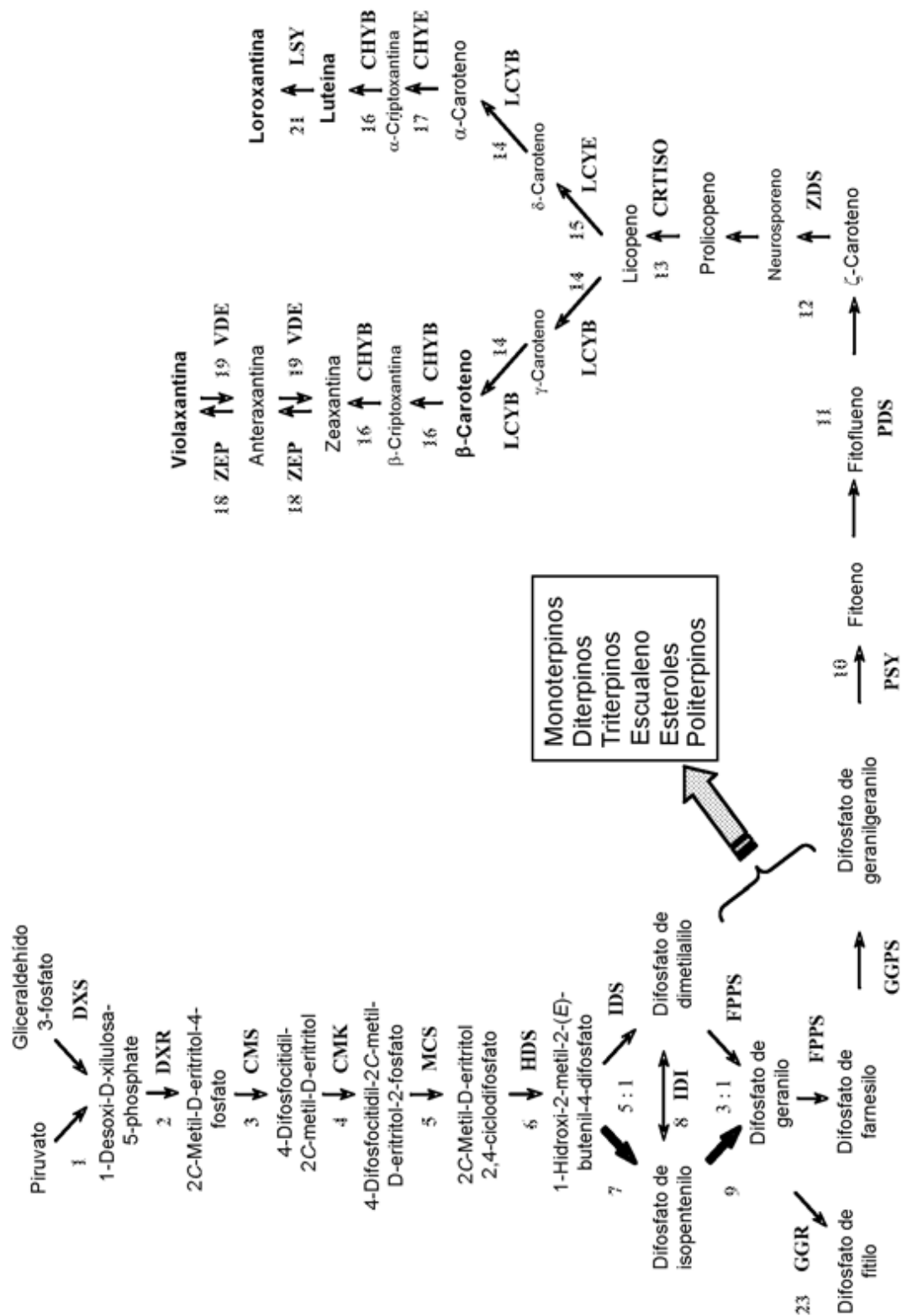


Figura 2

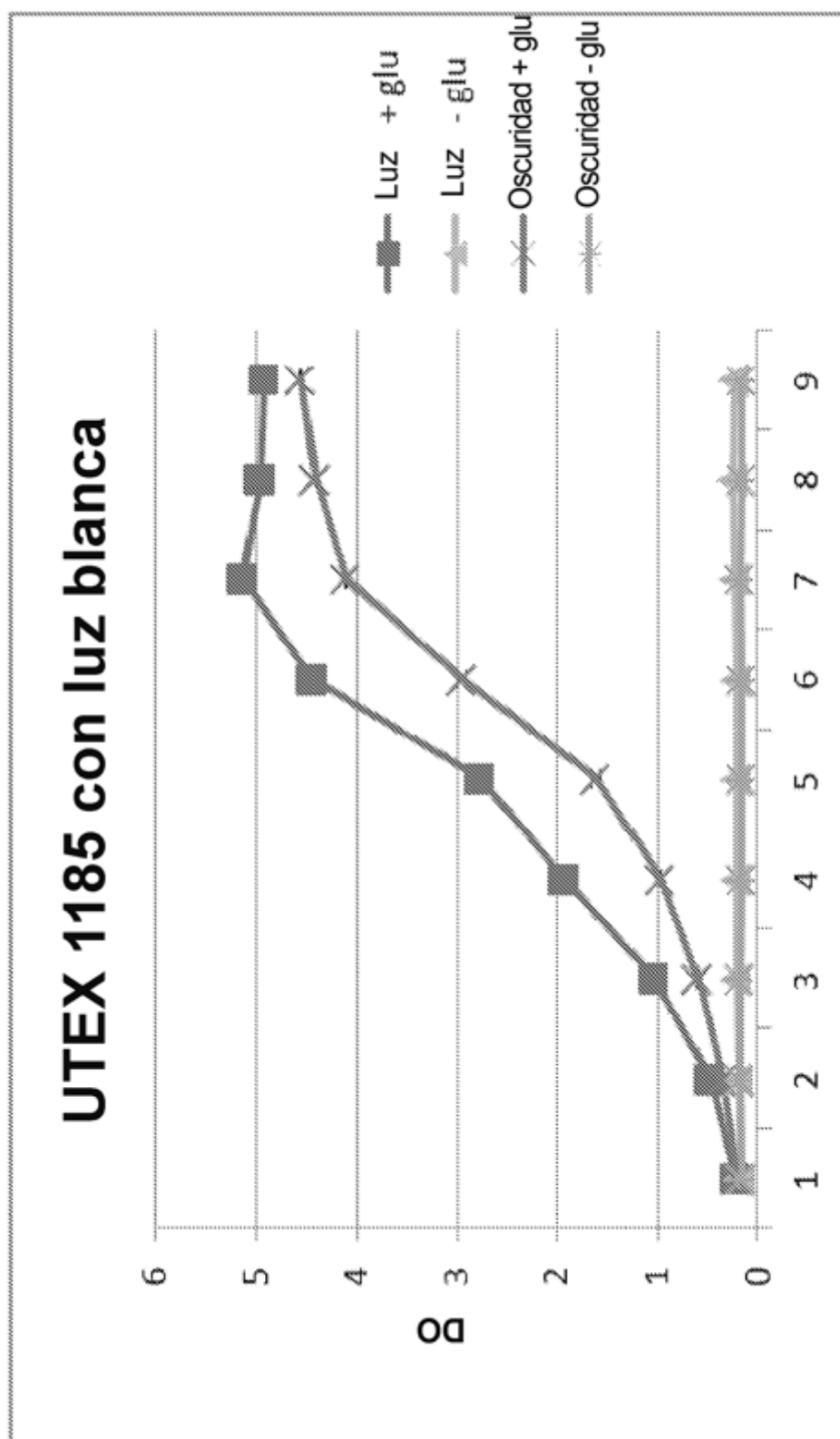


Figura 3A

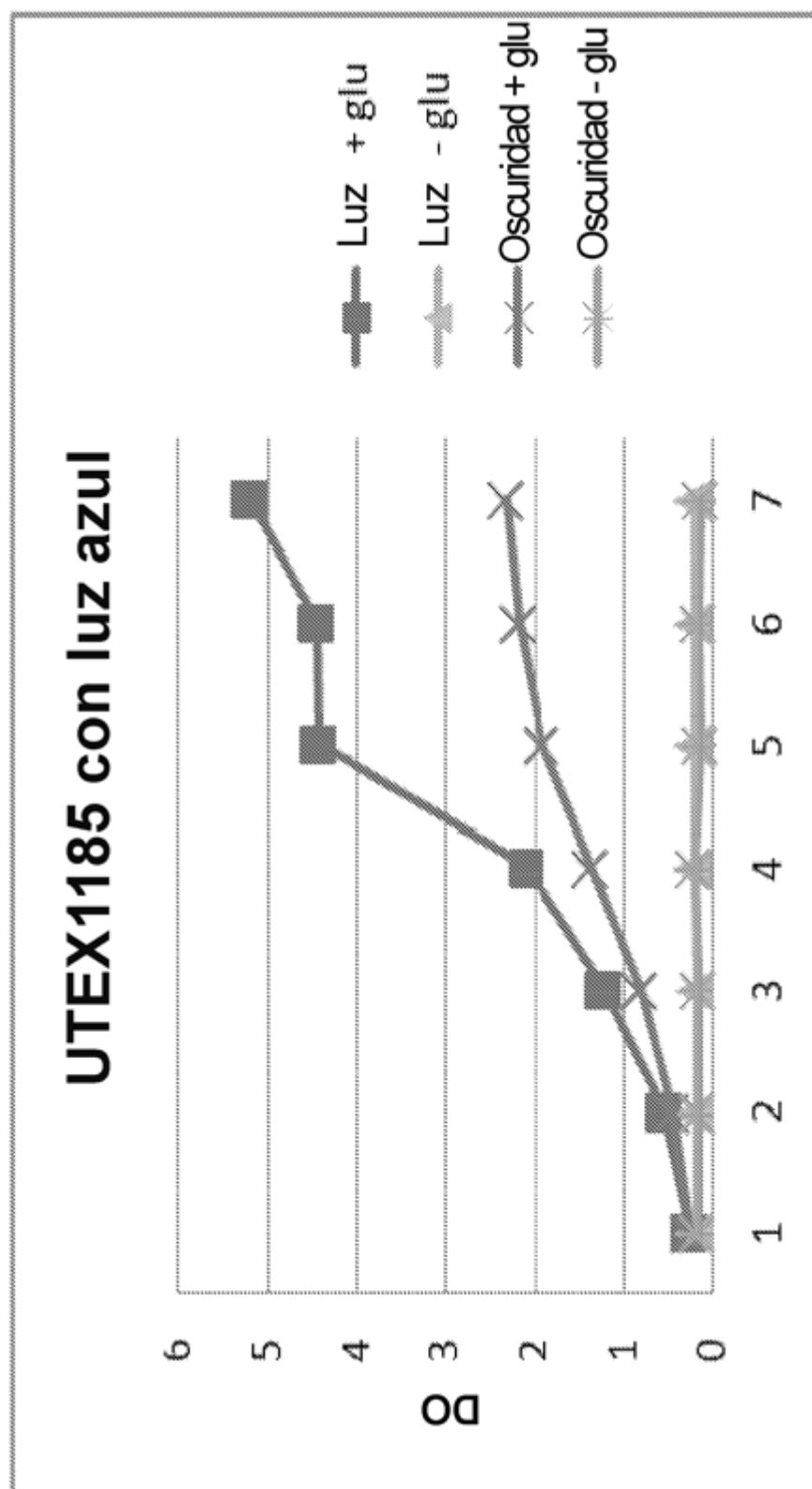


Figura 3B

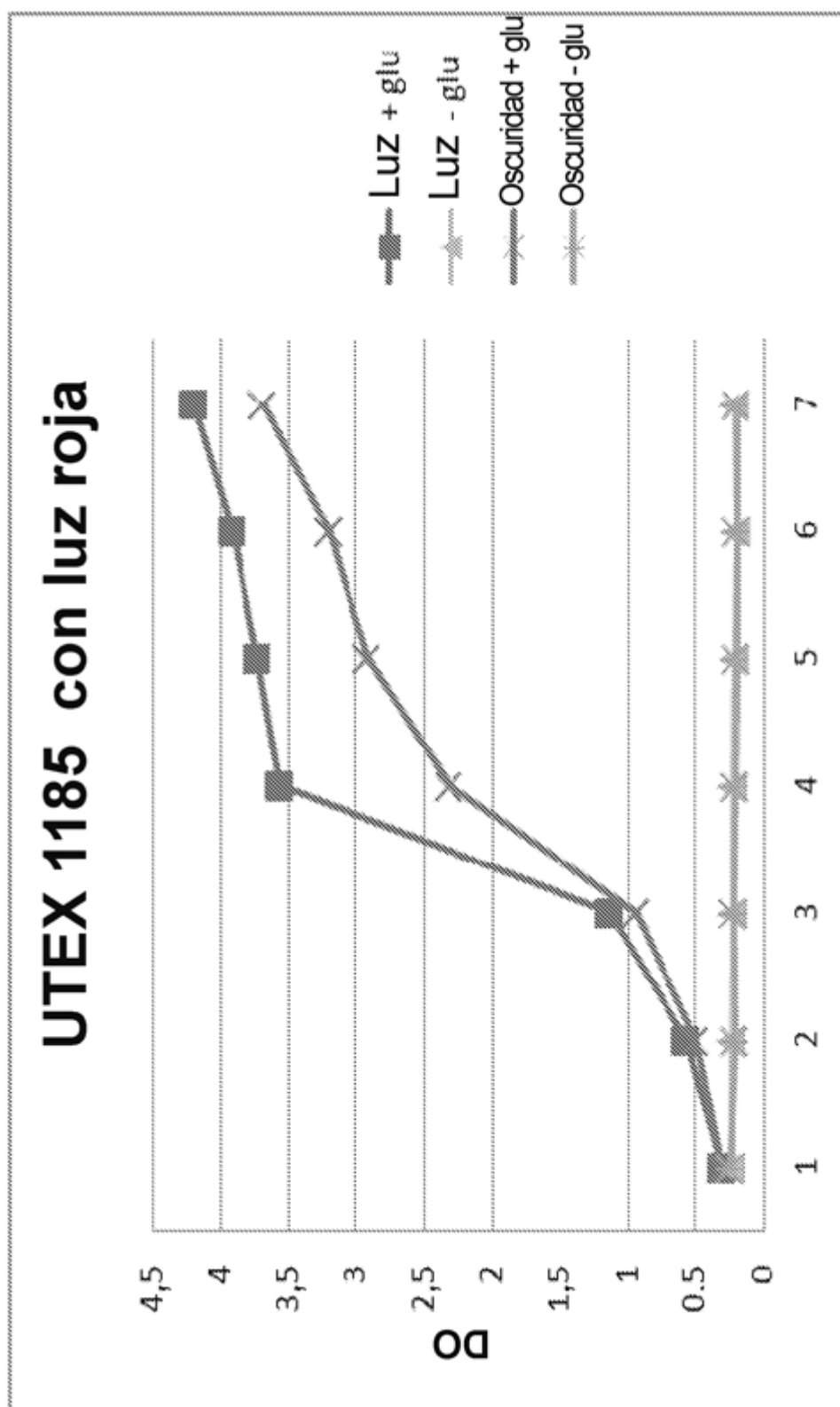


Figura 3C

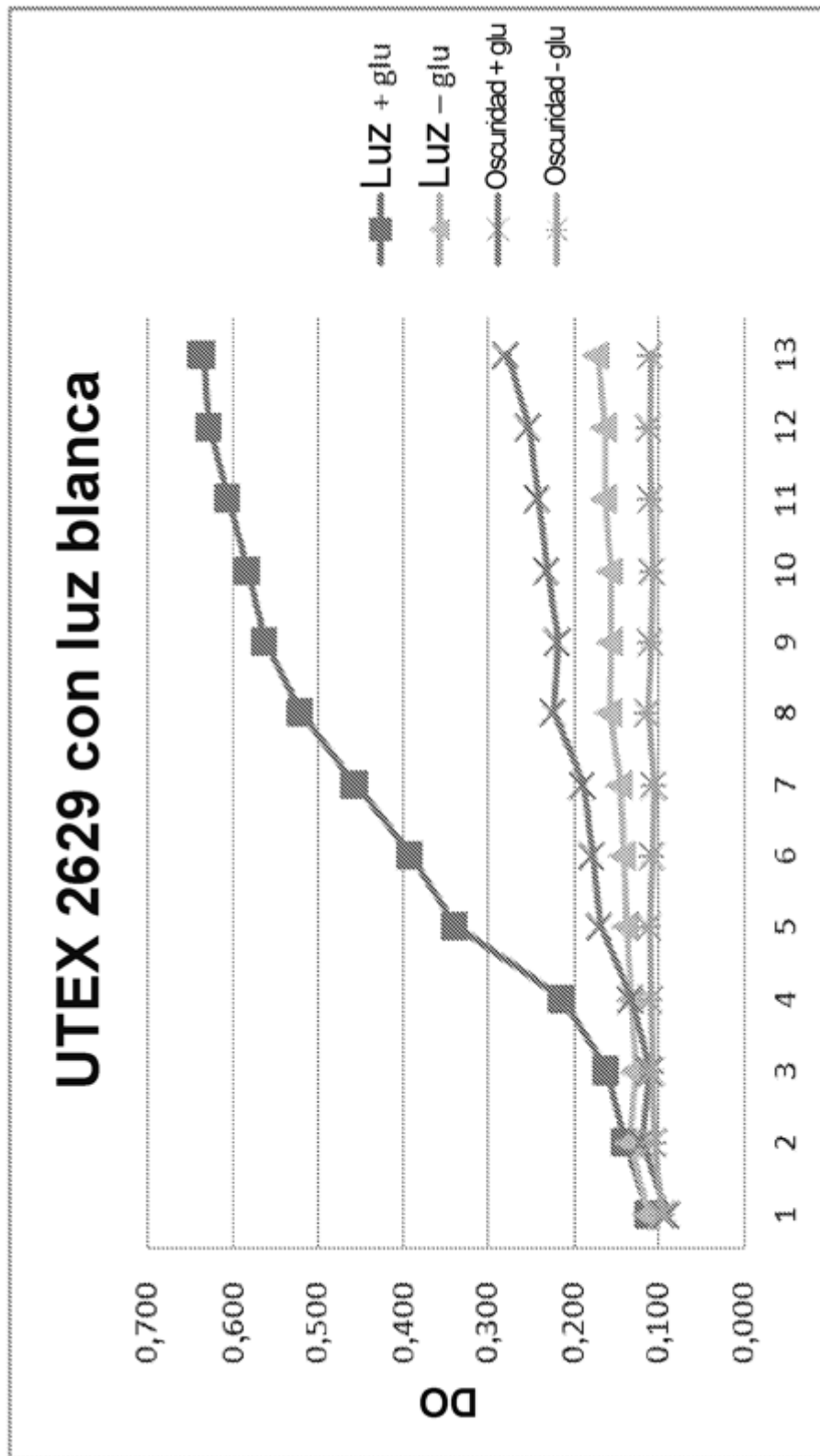


Figura 4A

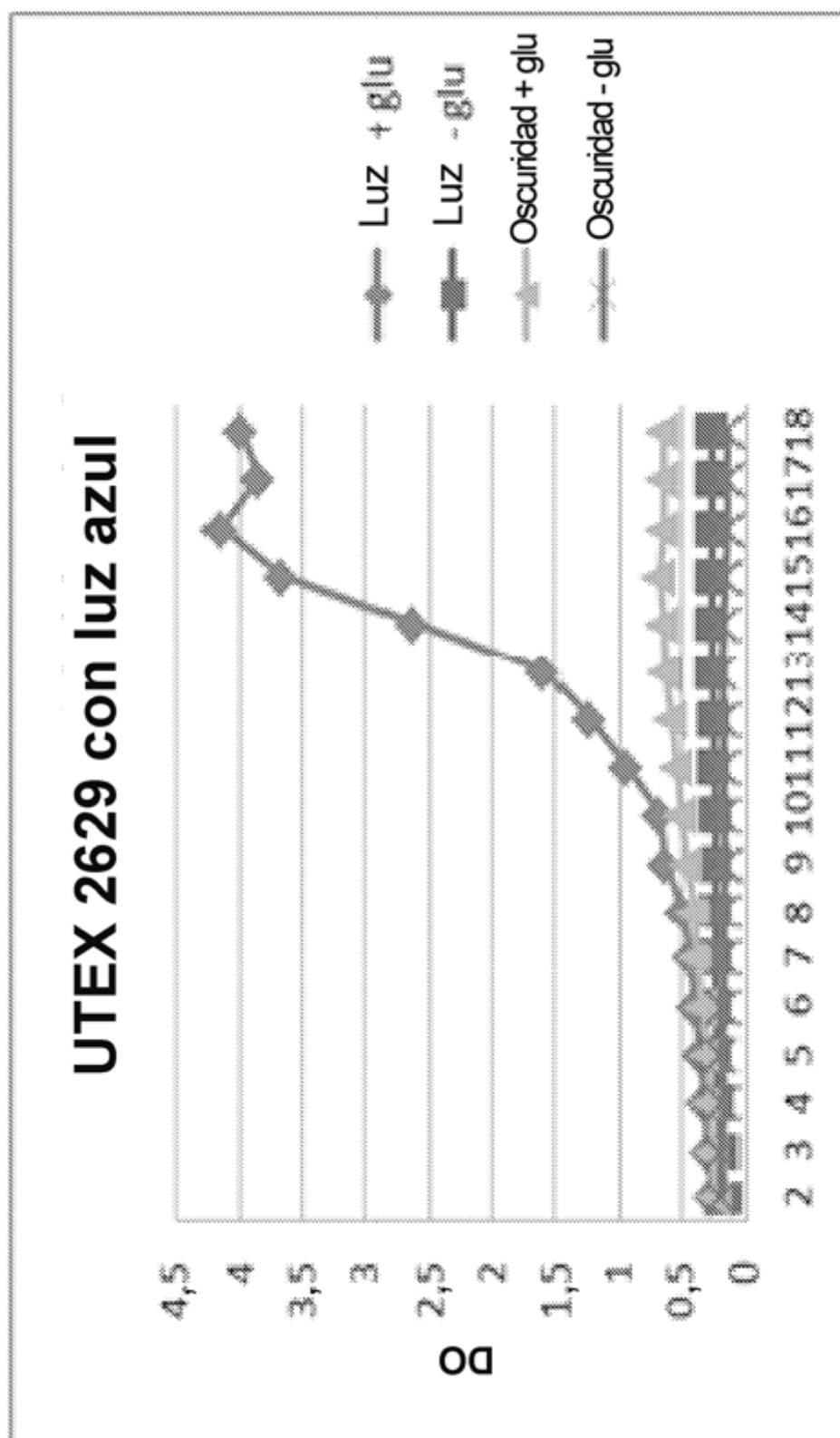


Figura 4B

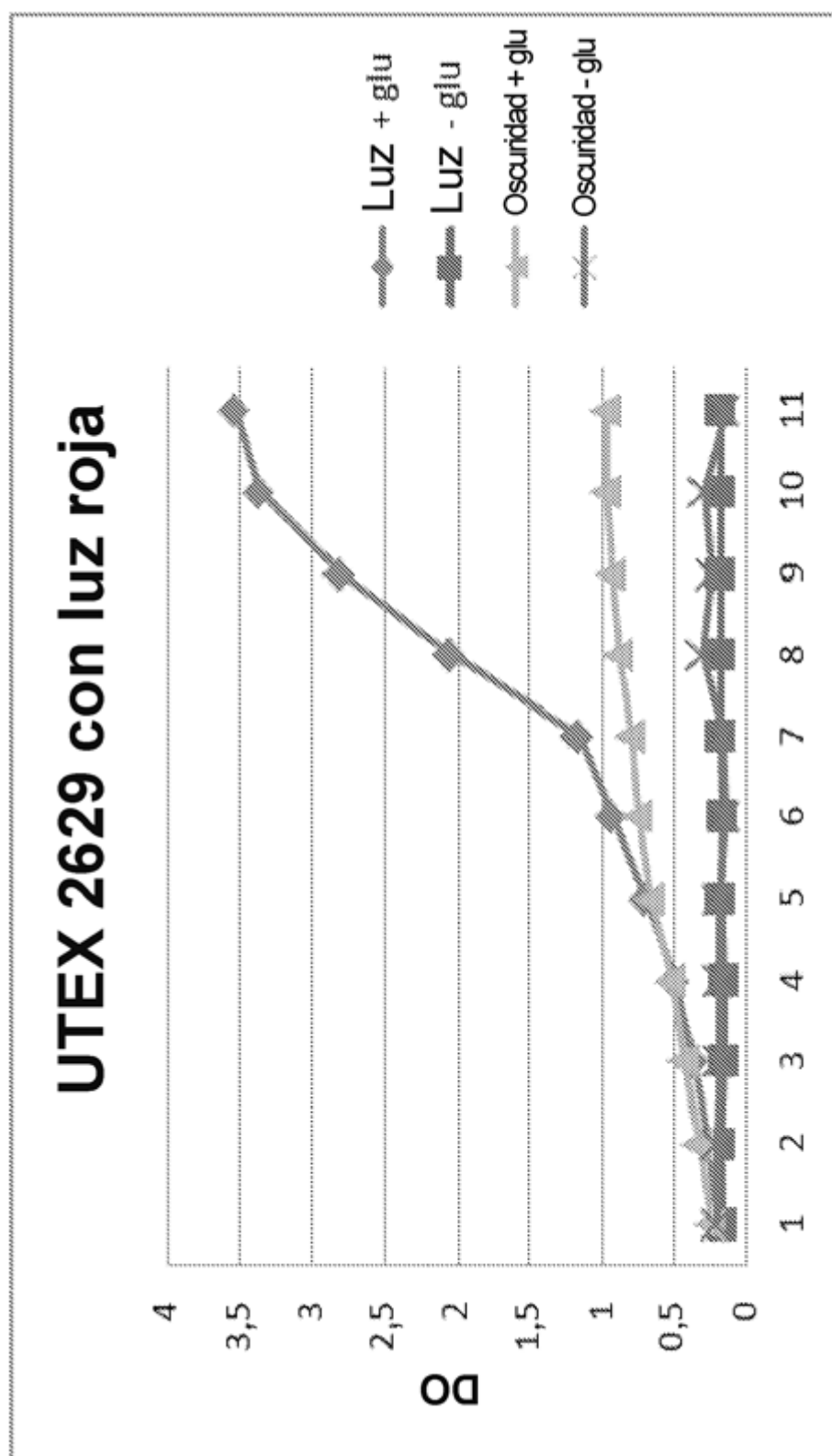


Figura 4C

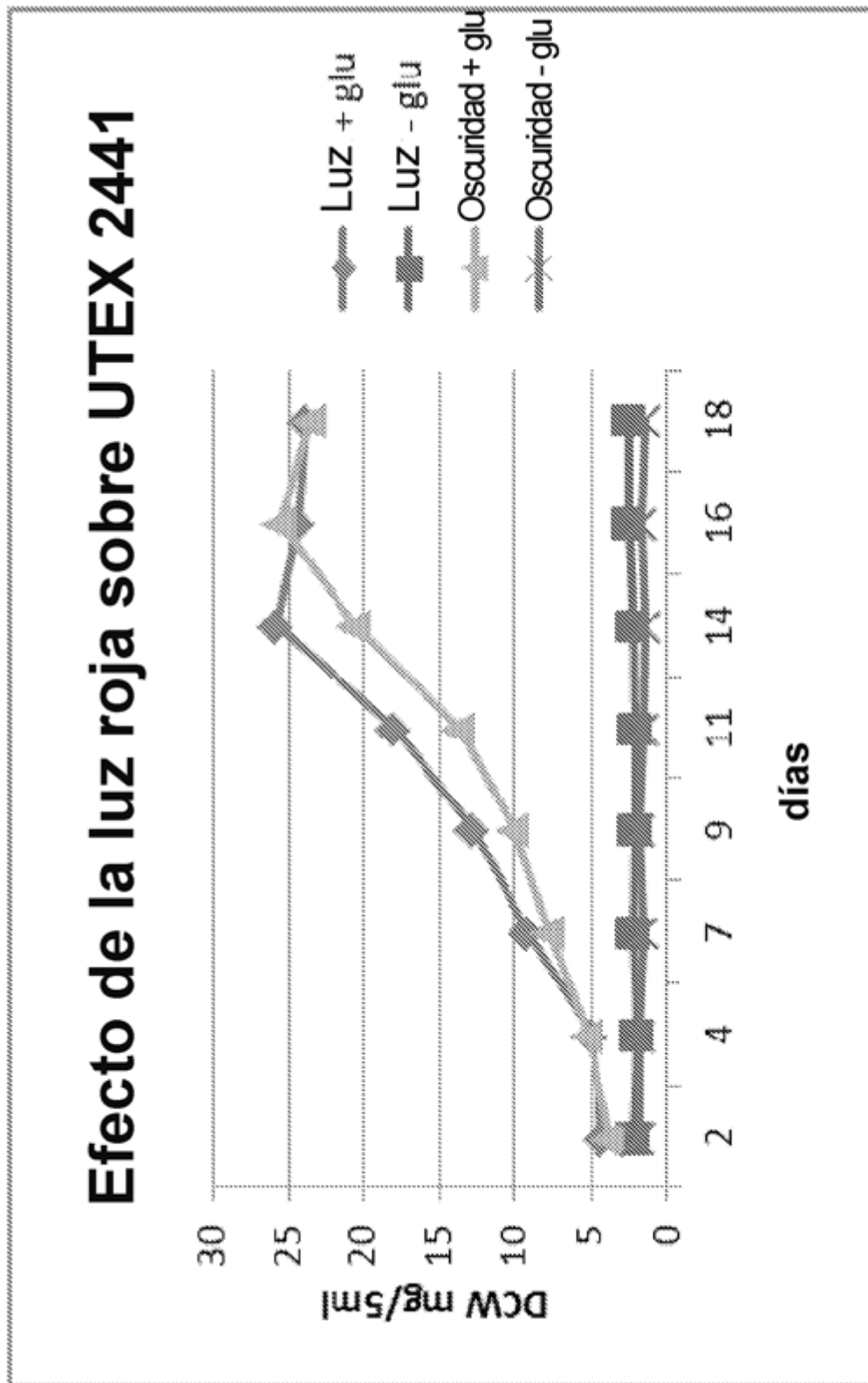


Figura 5A

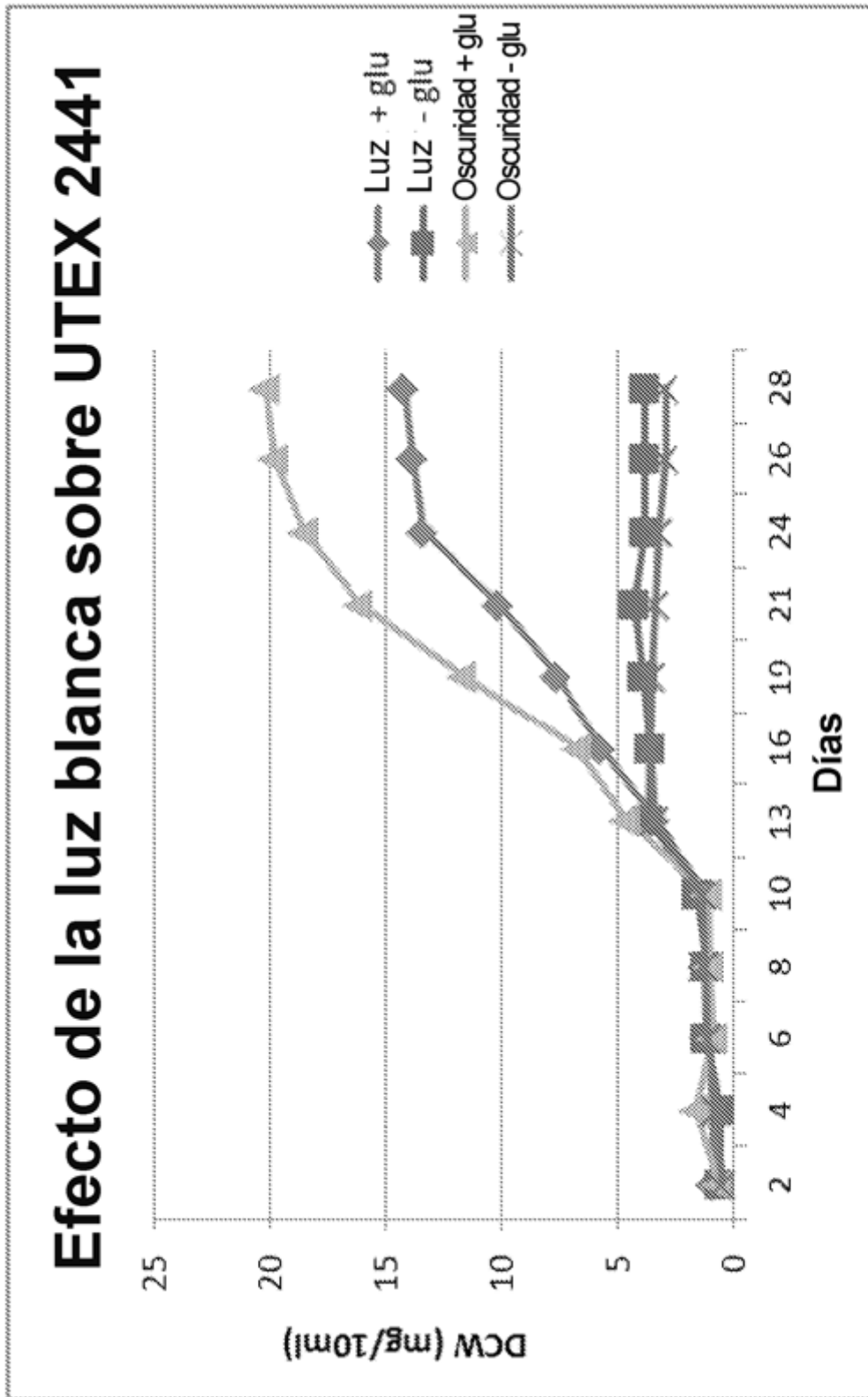


Figura 5B

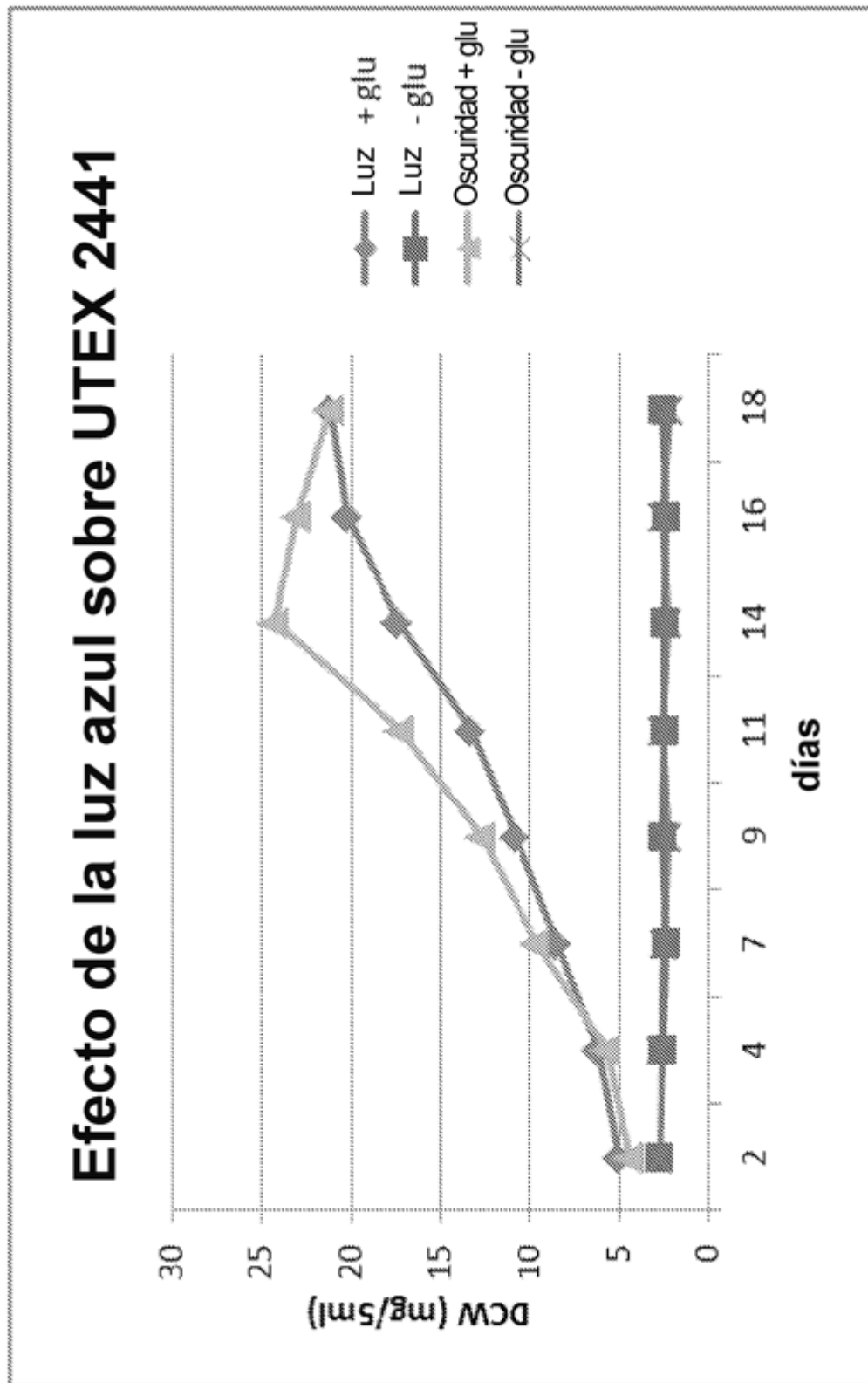


Figura 5C

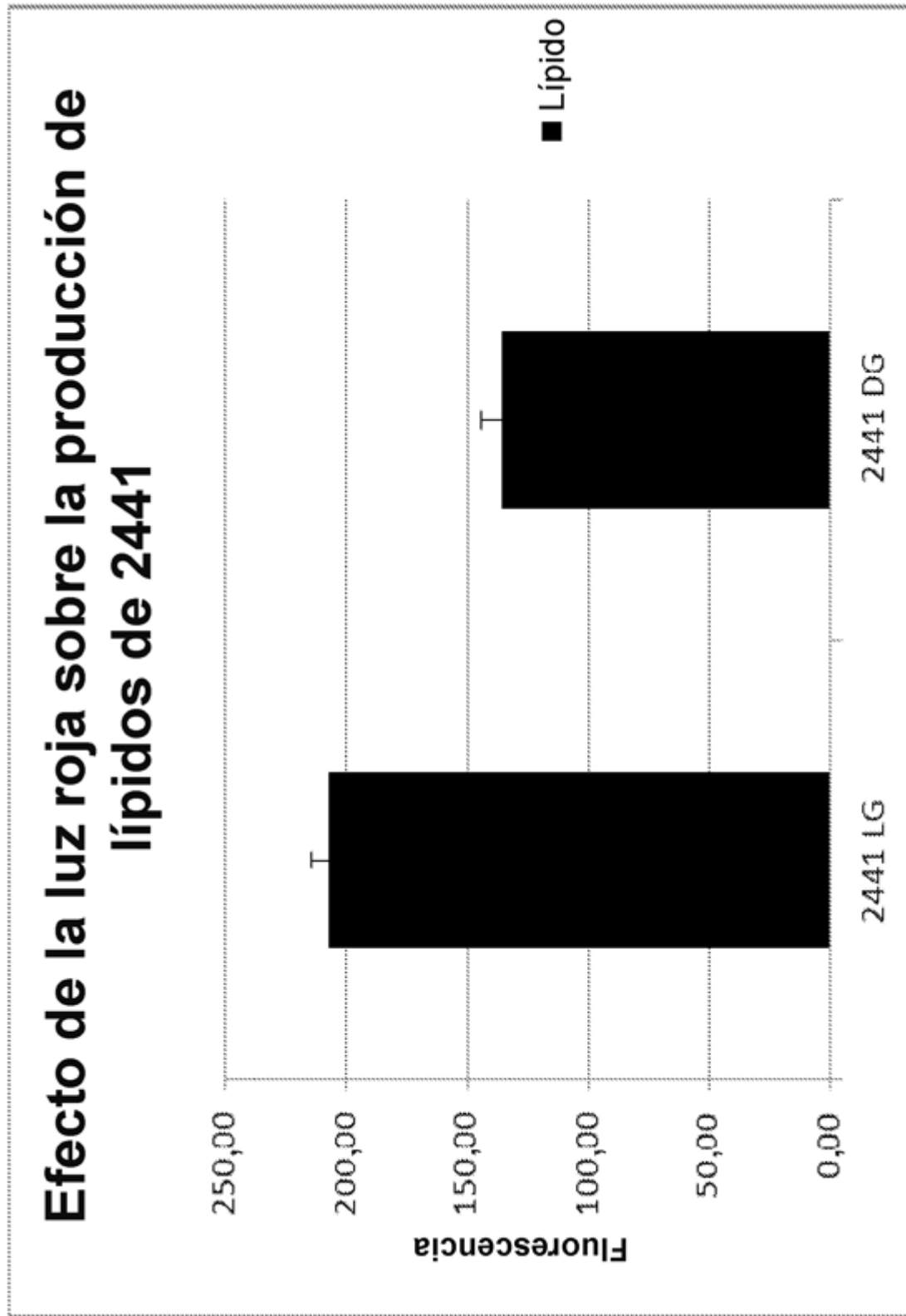


Figura 6

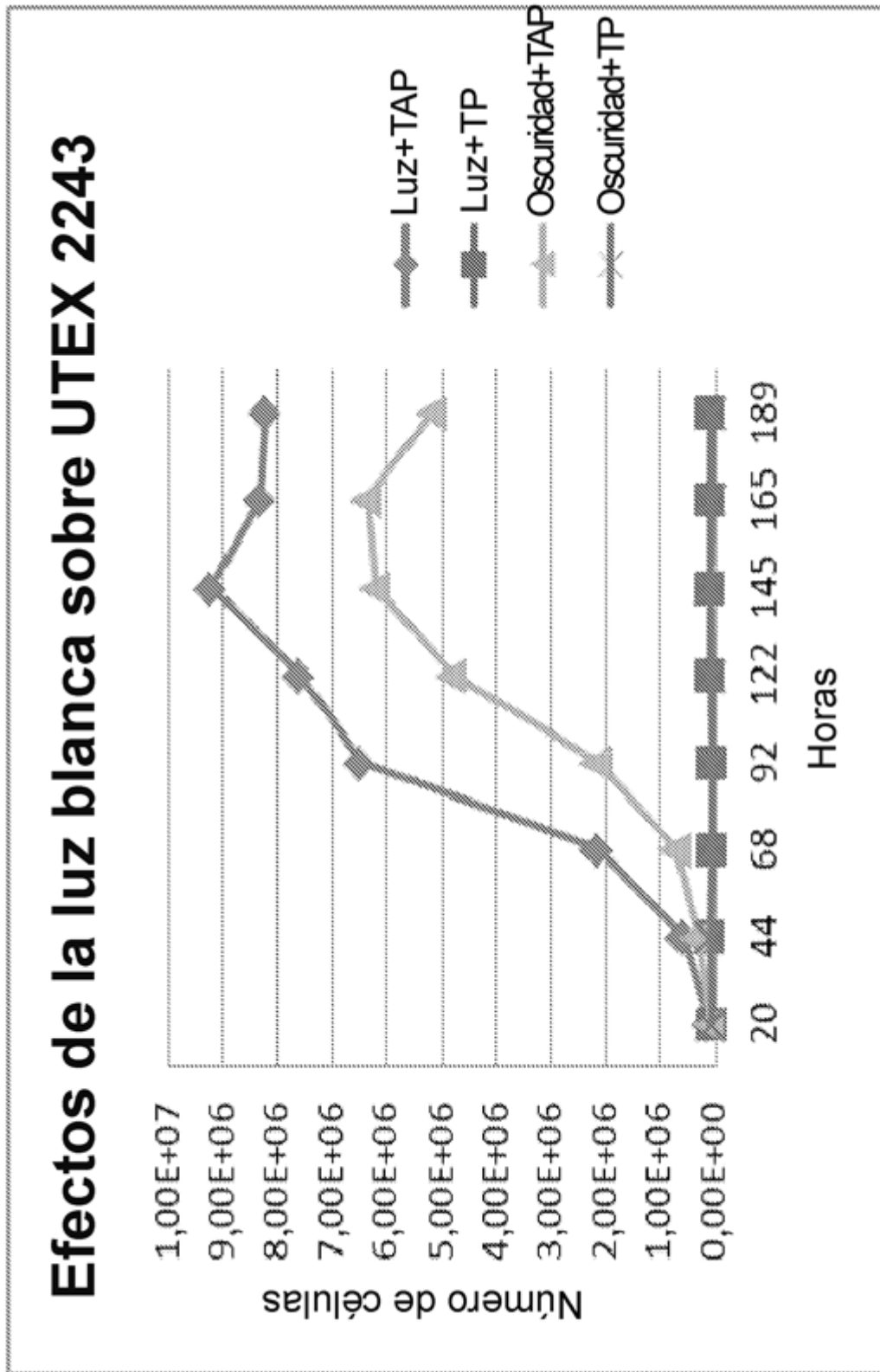


Figura 7