

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 063**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)
C11C 3/00 (2006.01)
C10L 1/02 (2006.01)
C10G 3/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2008 PCT/CN2008/072287**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2009 WO09143680**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2008 E 08800799 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2292782**

54 Título: **Método para la producción de biodiésel por cultivo de Chlorella en dos etapas, de la autótrofa a la heterótrofa**

30 Prioridad:

27.05.2008 CN 200810112998

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2018

73 Titular/es:

**TSINGHUA UNIVERSITY (100.0%)
 Haidian District
 Beijing 100084, CN**

72 Inventor/es:

**WU, QING-YU y
 XIONG, WEI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 662 063 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la producción de biodiésel por cultivo de *Chlorella* en dos etapas, de la autótrofa a la heterótrofa

5 **Campo de la invención**

Esta invención pertenece al campo de la bioenergía renovable, en particular se refiere a un nuevo método para producir biodiésel mediante un cultivo en dos etapas de *Chlorella* cultivada de cultivo autótrofo a cultivo heterótrofo. En concreto, inicialmente se permite que las células de *Chlorella* crezcan de manera autótrofa usando dióxido de carbono en condiciones de luz; luego, una vez concentradas las células, se añade al sistema una fuente de carbono orgánico (glucosa) para apoyar el crecimiento heterótrofo de *Chlorella*, mientras que los lípidos se acumulan significativamente en *Chlorella*, proporcionando así una materia prima amplia y barata para la producción de biodiésel a gran escala.

15 **Antecedentes de la invención**

Biodiésel se refiere a ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga obtenidos por reacción de esterificación de lípidos de animales, plantas o microorganismos. Debido a sus propiedades limpias, renovables y respetuosas con el medio ambiente, la industria del biodiésel ha atraído cada vez más atención y se ha desarrollado rápidamente en los grandes países consumidores de energía. Actualmente, la "primera generación" de biodiésel producido en Europa y América utiliza principalmente cultivos económicos (por ejemplo, soja, colza, palma, etc.) como materia prima principal. Dicha producción de bioenergía depende de la agricultura tradicional, lo que no solo da como resultado una baja productividad sino también en competencia con los cultivos de granos por recursos naturales (tierra, agua, fertilizantes, etc.) y por lo tanto la creciente demanda de materia prima en la industria de biodiésel no puede ser satisfecha. Por lo tanto, para aliviar la presión sobre la agricultura causada por la industria de la bioenergía, muchas empresas internacionales de energía y las industrias manufactureras han comenzado a dirigir sus esfuerzos hacia el uso de un material no alimentario, las microalgas, para desarrollar la llamada "segunda generación" de biocombustibles. (Peer MS, Skye RT, Evan S, et al.2008. Biocombustibles de segunda generación: microalgas de alta eficiencia para la producción de biodiésel. *Bioenergy Research* 1 (1): 20-43).

Las microalgas son un grupo de microorganismos fotosintéticos. Son capaces de absorber CO₂ de la atmósfera para sintetizar lípidos. Después de ser recolectados y procesados, pueden ser refinados para formar biodiésel como combustible para automóviles, e incluso como combustible para aviones después de su refinado adicional. Debido a las notables ventajas de los combustibles de microalgas (en primer lugar, pueden crecer en agua salada o residual, y no compiten por tierras agrícolas y agua dulce; en segundo lugar, tienen un increíble potencial de productividad y pueden reproducirse aproximadamente 40 veces más rápido que las plantas superiores), tienen un gran potencial para enfrentar el calentamiento global y satisfacer la demanda de combustibles no contaminantes. Sin embargo, todavía hay muchos problemas por resolver en la producción de biodiésel utilizando microalgas, por lo que los procesos correspondientes aún no pueden cumplir los requisitos de comercialización.

En la actualidad, existen principalmente dos enfoques para el cultivo a gran escala de microalgas: cultivo autótrofo y fermentación heterótrofa, cada uno de los cuales tiene ventajas y deficiencias en la producción de biodiésel. El cultivo autótrofo es una forma respetuosa con el medio ambiente en la se fija que el dióxido de carbono, el principal gas de efecto invernadero, y se libera oxígeno. Sin embargo, debido al sombreado mutuo entre las células de microalgas, la utilización de la luz a menudo es limitada. El efecto del sombreado se vuelve más obvio con el aumento de la concentración celular, y afecta significativamente al crecimiento de las células y la síntesis de lípidos, por lo que es difícil obtener alta densidad celular de microalgas oleaginosas en los fotobiorreactores. En cuanto al cultivo heterótrofo, el crecimiento de las células depende principalmente de la absorción de las células de las fuentes de carbono orgánico. Como no está limitado por la luz, se puede realizar fácilmente una fermentación de alta densidad y una síntesis de lípidos eficaz mediante la adición de flujo de carbono orgánico. En nuestro grupo, se usó por primera vez un alga verde de agua dulce *Chlorella protothecoides* que puede crecer tanto autótrofa como de manera heterótrofa en nuestra investigación para la producción de biodiésel por microalgas heterótrofas (Ver referencias: "Miao XL, Wu QY. 2006. Producción de biodiésel a partir de aceite de microalgas heterótrofas. *Technol* 97: 841-846", "Xu H., Miao XL., Wu QY. 2006. Producción de biodiésel de alta calidad a partir de microalga *Chlorella protothecoides* por crecimiento heterótrofo en fermentadores. *J Biotechnol* 126: 499-507", "Li XF., Xu H., Wu QY., 2007. Producción a gran escala de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella protothecoides* mediante un cultivo heterótrofo en biorreactores. *Biotechnology and Bioengineering*. 98 (4): 764-771", "Xiong W., Li XF., Xiang JY., Wu QY. 2008 Fermentación de alta densidad de microalga *Chlorella protothecoides* en biorreactor para producción de diésel por microbios. *Appl Microbiol Biotechnol* 78 (1): 29-36"). Actualmente, mediante el establecimiento de una estrategia de adición de flujo de alimentación adecuada, la densidad de *Chlorella* heterótrofa puede alcanzar hasta 100 g·l⁻¹ con un contenido de lípidos superior al 50 %. El cultivo heterótrofo tiene ventajas tales como una alta velocidad de crecimiento, ciclos cortos de cultivo y un proceso de cultivo fácil de controlar, pero el principal problema del cultivo heterótrofo de microalgas radica en el hecho de que este método depende del carbono orgánico (como la glucosa, el almidón, etc.) como materia prima, lo que aumenta el coste de producción.

Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas del cultivo autótrofo y la fermentación heterótrofa, proporcionamos un

proceso de fabricación de biodiésel mediante el primer cultivo autótrofo y a continuación heterótrofo de la siguiente manera: primero, *Chlorella* puede utilizar la fuente de carbono inorgánico (CO_2) y acumular biomasa bajo condiciones fotoautótrofas; a continuación concentrando las células; y complementándolas con una fuente de carbono orgánico (glucosa), para permitir que las células de *Chlorella* acumulen lípidos en gran cantidad. Debido a la
 5 utilización directa de energía lumínica en todo el proceso, aumenta la eficiencia de la utilización de energía, disminuye la cantidad de fuente de carbono orgánico utilizada y se absorbe una gran cantidad de gases de efecto invernadero, lo que hace que el proceso sea respetuoso con el medioambiente. En otro aspecto, en este proceso se adopta la técnica de concentración celular para evitar el problema de la luz limitada en cultivos autótrofos de alta concentración. Posteriormente, la introducción de la técnica de fermentación permite la acumulación rápida de
 10 lípidos durante el crecimiento heterótrofo de microalgas, que desempeña un papel clave en el aumento del rendimiento del biodiésel y en el control de los costes.

Contenido de la invención

15 El objetivo de esta invención es proporcionar un método para producir biodiésel mediante cultivo autótrofo seguido de cultivo heterótrofo de *Chlorella*. Basándonos en los hallazgos actuales de la investigación y la tecnología patentada para producir biodiésel mediante la fermentación de alta concentración de *Chlorella* heterótrofa, introdujimos procedimientos como el cultivo fotoautótrofo, la concentración de células y la prevención de contaminación por fermentación, entre otros, para cumplir con los requisitos de industrialización a gran escala de
 20 microalgas biodiésel. La clave de esta invención radica en el diseño y establecimiento de técnicas y procesos de cultivo autótrofo seguidos por cultivo heterótrofo de *Chlorella*, haciendo que las células de *Chlorella* crezcan rápidamente y acumulen biomasa en condiciones fotoautótrofas de baja concentración, y a continuación sintetizen lípidos en condiciones heterótrofas de alta concentración después de concentrarse.

25 La invención se refiere a un método de producción de biodiésel mediante un cultivo autótrofo a heterótrofo en dos pasos de *Chlorella*, caracterizado porque primero se utilizan células de microalgas con un contenido de lípidos superior al 50 % obtenido por cultivo autótrofo y a continuación se utiliza cultivo heterótrofo como materia prima para producir biodiésel; el método comprende los siguientes pasos: (1) cultivar de manera autótrofa *Chlorella*; (2) concentrar las células; (3) fermentar de manera heterótrofa; (4) recolectar y secar células de algas; (5) extraer lípidos
 30 de las células de algas secas; y (6) producir biodiésel por reacción de esterificación.

Los procesos técnicos, métodos y pasos implicados en el contenido de esta invención se describen en detalle a continuación:

35 (1) Cultivo autótrofo fotosintético de *Chlorella*
 El alga verde de agua dulce *Chlorella protothecoides* se inocula en un aparato de fotobiorreacción y se deja crecer con luz en medio autótrofo; los aparatos de fotobiorreacción incluyen un matraz aireado, un fotobiorreactor y un estanque abierto. Las condiciones de cultivo específicas se ajustan de la siguiente manera: la temperatura se controla en el intervalo de 20-45 °C, la temperatura óptima es de 30 °C; la concentración inicial de glicina es
 40 de 1 a 15 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, con preferencia de 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; el pH se controla de 5 a 9, con preferencia de 6,5; la entrada de aire o una mezcla de aire y CO_2 a una velocidad de 50-300 l/h, con preferencia de 80-120 l/h. Se usa una intensidad de la luz a 25-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante el proceso de cultivo. El tiempo total de cultivo depende del crecimiento celular, y generalmente es de 50 a 400 horas, con una preferencia de 120 a 200 horas.

(2) Concentración de células
 45 Las células se concentran usando tecnologías de centrifugación, floculación o filtración de alta velocidad. Por ejemplo, utilizando la centrifugación a alta velocidad en condiciones estériles, la fuerza centrífuga se ajusta en 2000-8000 g, y la centrifugación se realiza a 4 °C durante 2-5 minutos. El sobrenadante se descarta después de la centrifugación y se retiene el sedimento de células autótrofas.

(3) Fermentación heterótrofa
 50 En el proceso de conversión de *Chlorella* de crecimiento autótrofo a heterótrofo, tanto las características de crecimiento como la composición bioquímica de las células sufren cambios obvios: el contenido de clorofila disminuye, la estructura de lamelas fotosintéticas desaparece y la densidad celular disminuye. Al añadir carbono orgánico, es posible dirigir la mayor parte del flujo metabólico hacia la vía de síntesis de lípidos. Para este propósito, los procesos para el cultivo heterótrofo de alta densidad celular y la síntesis de lípidos se ajustan de la
 55 siguiente manera:

Las células recolectadas de manera autótrofa se resuspenden en medio estéril que contiene una fuente de carbono orgánico, haciendo que la densidad inicial de las células se encuentre entre 5 y 100 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, en el que la fuente de carbono orgánico se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa, hidrolizados de
 60 maíz, yuca o almidón de trigo, y jugo de sorgo, etc., y la concentración inicial de azúcar reductor está entre 0,01 y 100 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, preferentemente 23 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

La fermentación heterótrofa se puede realizar en aparatos de fermentación de diferentes volúmenes. Antes de la fermentación, deben instalarse los electrodos de temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD) y el electrodo de deformación, y se añade el medio heterótrofo y se esteriliza en autoclave. Las condiciones de fermentación se
 65 ajustan de la siguiente manera. En primer lugar, la presión en el recipiente, el caudal de aire y la velocidad de

agitación se ajustan para que la saturación de oxígeno inicial alcance el 100 %; la temperatura se ajusta entre 15 y 45 °C, preferentemente a 29 °C; el caudal de aire está entre 100 y 300 l/h; y se añade una solución ácida o básica (KOH, H₂SO₄, etc.) para mantener el pH del sistema de fermentación en el intervalo de 5,0-9,0. Durante el proceso de fermentación, la velocidad de agitación se controla para mantener la saturación de oxígeno por encima del 10 %. Cuando la fuente de carbono se agota y el nivel de OD aumenta repentinamente, la fuente de carbono orgánico se introduce para mantener la concentración del azúcar reductor en el caldo en el intervalo de 1-40 g·l⁻¹. Se toman muestras regularmente para determinar la densidad celular y la concentración del azúcar reductor restante en el medio para controlar el consumo de fuentes de carbono y el crecimiento celular. Se usan tinción con rojo Nilo y el ensayo de fluorescencia para detectar el cambio de lípidos neutros en las células. La fermentación debe finalizar cuando la densidad celular excede los 100 g·l⁻¹ y el contenido de lípidos alcanza más del 50 % del peso seco de las células. El tiempo de fermentación total es entre 50 y 300 horas.

Para evitar la posible contaminación por microorganismos indeseados durante el cultivo autótrofo y los procesos de concentración celular, se añaden agentes antibacterianos que inhiben el crecimiento de microorganismos. Los agentes antibacterianos son cloranfenicol o monofluoroacetato de sodio (MFA). El cloranfenicol se usa a una concentración final entre 0,002 y 0,2 g·l⁻¹, preferentemente 0,01 g·l⁻¹, o monofluoroacetato de sodio (MFA) a una concentración final entre 0,1 y 100 mM, preferentemente 2 mM.

(4) Cosecha y secado de células de algas

Se emplea tecnología de separación de fases sólido-líquido para recoger células de algas del caldo de fermentación. Este proceso incluye precipitación, filtración, centrifugación y secado. Las células de algas obtenidas por separación se almacenan como polvo seco, los métodos de secado incluyen liofilización, secado por pulverización, etc.

(5) Extracción de lípidos de células de algas secas

El método de extracción de lípidos de las células de algas secas comprende extracción por solvente a alta presión o extracción Soxhlet. Cuando se utiliza el método de extracción Soxhlet, se utiliza hexano como disolvente de extracción convencional. Lavando repetidamente con hexano, los lípidos se separan del polvo de algas hasta que no quedan lípidos en las células. Finalmente se realiza una destilación para eliminar el solvente.

(6) Esterificación para generar biodiésel

Se lleva a cabo la esterificación para producir biodiésel a partir de los lípidos extraídos de las células de algas. La conversión de ácidos grasos a ésteres de ácidos grasos incluye, pero no se limita a, catálisis con ácido fuerte (por ejemplo, ácido sulfúrico concentrado) o con lipasa, etc. Los ésteres metílicos de ácidos grasos resultantes de esta catálisis son el componente principal del biodiésel.

El medio de cultivo autótrofo discutido anteriormente consiste en lo siguiente: KH₂PO₄: 0,2~0,7 g·l⁻¹, K₂HPO₄: 0,1~0,4 g·l⁻¹, MgSO₄·7H₂O: 0,1~0,4 g·l⁻¹, FeSO₄·7H₂O: 0,1~3 mg·l⁻¹, glicina: 0,1~15 g·l⁻¹, vitamina B1: 0,001~0,1 mg·l⁻¹, oligoelemento líquido A5: 0,1~5 ml·l⁻¹; en el que el oligoelemento líquido A5, que se conoce del documento CN 1 837 352 A, se compone de: H₃BO₃: 2,86 g·l, Na₂MoO₄·2H₂O: 0,039 g·l, ZnSO₄·7H₂O: 0,222 g·l, MnCl₂·4H₂O: 1,81 g·l, y CuSO₄·5H₂O: 0,074 g·l⁻¹.

La composición del medio de cultivo heterótrofo es la misma que la anterior, excepto por la ausencia de glicina y la adición de una fuente de carbono orgánico para mantener la concentración inicial de azúcar reductor de 0,01 a 100 g·l⁻¹. Durante el cultivo heterótrofo, la fuente de carbono orgánico se añade continuamente para mantener la concentración de azúcar reductor en el intervalo de 1-30 g·l⁻¹.

Los beneficios de la presente invención radican en el hecho de que esta invención adopta el proceso del primer cultivo autótrofo y a continuación el cultivo heterótrofo, y optimiza y combina respectivamente el crecimiento de células de algas y la síntesis de grasas, por lo que la técnica de concentración celular empleada puede evitar eficazmente el problema de la luz limitada en el cultivo autótrofo de alta densidad. Esta invención no solo asegura una mayor eficiencia de conversión de energía luminosa, sino que también genera una mayor cantidad de grasa. La densidad de células de algas finalmente obtenida (rendimiento unitario) alcanza hasta 108 g/l (peso seco), y el contenido de lípidos de las células es de más del 50 %. La capacidad de producción también se mejora mucho con respecto al cultivo autótrofo tradicional, mientras que el consumo de glucosa y las emisiones de dióxido de carbono son significativamente menores que en el cultivo heterótrofo. Esta tecnología que controla efectivamente los costes de materia prima del biodiésel y satisface los requisitos para la producción industrial de biodiésel por microalgas es un enfoque novedoso y muy eficiente para producir lípidos de materia prima de biodiésel.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1 Procesos operativos y diagrama de flujo de la producción de biodiésel usando *Chlorella* crecida en cultivo de dos etapas de autótrofo a heterótrofo.

Fig. 2 Curva de crecimiento autótrofo de células de *Chlorella* en un fotobiorreactor.

Fig. 3 Curva de crecimiento y curva de consumo de glucosa de células de algas en un biorreactor de 5 l después de la conversión a cultivo heterótrofo. ((♦) glucosa, (□) peso seco de células)

Fig. 4 Cambios en la intensidad de fluorescencia de las células teñidas con rojo Nilo medidos por espectrometría fluorescente (la Fig. 4B muestra los resultados de la tinción de *Chlorella* autótrofa, y la Fig. 4A muestra los resultados de tinción de *Chlorella* después de la conversión a cultivo heterótrofo. El pico de emisión de clorofila está a 680 nm, y el pico de emisión del rojo Nilo está a 570 nm)

Modo para llevar a cabo la invención

Esta invención proporciona un método de producción de biodiésel utilizando el cultivo en dos etapas de *Chlorella* desde la fase autótrofa hasta la fase heterótrofa. Basándose en los hallazgos de investigación actuales y las tecnologías patentadas para producir biodiésel mediante la fermentación heterótrofa de microalgas, esta invención cumple además los requisitos de la producción industrial a gran escala de biodiésel utilizando microalgas mediante el cultivo de algas fotoautótrofas, la concentración de células y la prevención de contaminación bacteriana no deseada, etc. La tecnología, el método, los siguientes pasos del proceso como se muestra en la Figura 1 y la invención se ilustran adicionalmente mediante los ejemplos proporcionados.

Ejemplos

Se adquirió *Chlorella protothecoides*, una cepa de microalgas oleaginosas de la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Texas en los Estados Unidos. Desde 1990, esta cepa se ha cultivado en el Laboratorio de Algas para Bioenergía del Departamento de Ciencias Biológicas y Biotecnología de la Universidad de Tsinghua para la investigación en bioenergía. El medio autótrofo consistió en: KH_2PO_4 : $0,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, K_2HPO_4 : $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, glicina: $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, vitamina B1: $0,03 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, y solución de oligoelemento A5 $1,5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$, en donde la solución de oligoelemento A5 consistía en H_3BO_3 : $2,86 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $0,039 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $0,222 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$: $1,81 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, y $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$: $0,074 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Como se describe en la etapa (1), se inoculó una única colonia de *Chlorella* cultivada en medio sólido en un matraz aireado de 1 l para obtener una densidad celular inicial de $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. El matraz se colocó en una cámara de luz y se incubó a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, y se hizo circular aire a un caudal de 100 l/h. El pH del cultivo se controló en el intervalo de 5-9. Durante el cultivo autótrofo, se investigaron los efectos de diferentes condiciones de cultivo, tales como fuentes de nitrógeno, intensidad de luz, etc. sobre el crecimiento de las células de *Chlorella*. El proceso de optimización de las condiciones de crecimiento fue el siguiente: se usaron respectivamente 1, 3, 5, 7 o $9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de glicina en el medio, y el cultivo se llevó a cabo bajo intensidades de luz de 25, 50, 100 o $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los resultados de optimización mostraron que, bajo las condiciones de circulación de aire y temperatura anteriores, las células crecieron mejor con glicina a $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ e intensidad de iluminación de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (como se muestra en la figura 2).

Cuando las células entraron en la etapa final de la fase logarítmica, se detuvo el burbujeo de aire y el cultivo se mantuvo inmóvil durante 12 horas para permitir que las células se asentaran. El sobrenadante se descartó y el medio de cultivo restante se eliminó adicionalmente mediante centrifugación a 3000 g durante 2 minutos. El proceso se realizó en condiciones estériles.

Se preparó un fermentador de 5 l (MINIFORS, Suiza), con los electrodos de temperatura, pH, OD (ajustado) y el electrodo de deformación ajustado, luego se añadió medio heterótrofo, y se esterilizó a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. La composición del medio heterótrofo fue la siguiente: KH_2PO_4 : $0,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, K_2HPO_4 : $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, vitamina B1: $0,08 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, oligoelemento líquido A5 $1,5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ y glucosa $23 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Se añadió monofluoroacetato de sodio (MFA) a una concentración final de 1 mM para evitar la contaminación microbiana. Las células de *Chlorella* autótrofas recogidas se resuspendieron y se transfirieron al fermentador, lo que da una densidad celular inicial de $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Las condiciones para el cultivo heterótrofo se establecieron de la siguiente manera: la temperatura se mantuvo a $29 \text{ }^\circ\text{C}$, el flujo de aire se ajustó a 150 l/h, el pH se ajustó a $6,2\pm 0,2$ mediante la adición de ácido o base (por ejemplo, KOH, H_2SO_4 , etc.). El oxígeno disuelto se controló en línea. Una vez que el oxígeno disuelto era inferior al 10 % de la saturación, la velocidad de agitación se incrementó gradualmente para mantener la saturación del oxígeno disuelto en el fermentador por encima del 10 %. Cuando la fuente de carbono se agotó y el nivel de oxígeno disuelto (OD) aumentó abruptamente, se añadió glucosa para mantener la concentración de glucosa como azúcar reductor en el intervalo de $1\text{-}30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Se estableció una estrategia de cultivo de alta densidad mediante cultivo discontinuo y control del proceso en un generador de 5 l: se monitorizaron los cambios en oxígeno disuelto, glucosa y densidad celular en el fermentador, mientras que el contenido de lípidos neutros en las células de algas también se midió utilizando la técnica de fluorescencia mediada por rojo Nilo (véanse, procedimientos específicos descritos en "Danielle E, David J, Barry R., et al., 2007. Medición fluorescente de lípidos neutros de microalgas. *Journal of Microbiological Methods*, 68 (3): 639-642"). La densidad celular durante el proceso de fermentación se estimó mediante mediciones periódicas de densidad óptica ($\text{DO}_{540\text{nm}}$). La relación lineal entre la $\text{DO}_{540\text{nm}}$ y el peso seco de las células puede expresarse mediante la siguiente ecuación: $y = 0,4155x$, ($R^2 = 0,9933$, $P < 0,05$), en la que y representa la densidad celular ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) y x representa la densidad óptica a 540 nm. Después de la fermentación, las células se recogieron del caldo de fermentación por centrifugación, y a continuación se secaron al vacío. El caldo de fermentación se centrifugó a 8000 g durante 2 minutos, y el sedimento se recogió y a continuación se secó al vacío. Después del pesaje, se obtuvieron $108 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de polvo de algas secas en total (véase la Fig. 3).

Usando el extractor Soxhlet, un dispositivo de extracción de disolvente semiautomático con hexano como disolvente convencional, se extrajeron lípidos del polvo de algas. Las células se lavaron repetidamente con hexano en el extractor Soxhlet, hasta que no quedaron lípidos en las células. Los pesos moleculares de los lípidos de algas cultivadas de manera heterótrofa se calcularon como sigue: peso molecular (M) = $561 \times 1000 \times 3 / (\text{SV} - \text{AV})$, en la que

SV representa el valor de saponificación de lípidos de microalgas, y AV (valor ácido) representa el valor ácido de los lípidos de microalgas, y el valor de la masa molecular resultante calculado es un número adimensional.

5 Después de la evaporación rotatoria con descompresión del disolvente, los lípidos obtenidos por extracción con Soxhlet se secaron y a continuación se pesaron. El peso neto de los lípidos se dividió entre el peso seco de las células y el contenido de lípidos en el peso seco de las células fue del 52 % (p/p). El consumo total de glucosa durante todo el proceso de cultivo fue de $280 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, y el rendimiento de lípidos fue de $56,16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (es decir, $108 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \times 52 \%$), lo que indica una velocidad de conversión del 20,06 %. De acuerdo con nuestros datos experimentales previos, cuando se usa fermentación heterótrofa de alta densidad, las velocidades de conversión de azúcar a lípido fueron aproximadamente del 10 al 17 %. Esto indica que, en condiciones equivalentes, el proceso de cultivo en dos etapas puede reducir efectivamente el consumo de la fuente de carbono orgánico.

15 La esterificación se realizó mediante catálisis concentrada de ácido sulfúrico. Se puso una cierta cantidad de lípidos de algas en un matraz, y se añadió una cantidad igual de ácido sulfúrico concentrado como catalizador. También se añadió disolvente de metanol de modo que la relación molar de metanol a lípido fue de 30:1. La reacción se llevó a cabo en una incubadora a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ con una velocidad de giro de 160 revoluciones por minuto durante 48 horas. Después de que se completó la reacción, la mezcla de reacción formó dos capas. El biodiésel contenido en la capa superior se aisló y se lavó con agua tibia a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego se llevó a cabo la evaporación rotatoria para eliminar el disolvente y se obtuvo el biodiésel puro.

20 Mediante cromatografía-espectrometría de masas, se puede analizar el contenido de tri-, di- y monoglicéridos, metanol y glicerol, etc. en el sistema, en función del cual se puede calcular la velocidad de conversión de lípidos a ésteres metílicos de ácidos grasos. Se empleó la cromatografía de gases DSQ GC (Thermo, EE.UU., VARIAN VF-5ms Capilar 30M * 0,25MM)-espectrometría de masas para el análisis. La velocidad de flujo se ajustó a 10 ml min^{-1} . El procedimiento para elevar la temperatura fue el siguiente: la temperatura se aumentó primero a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ y se mantuvo durante 2 minutos; luego se aumentó a $300 \text{ }^\circ\text{C}$ a una velocidad de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, y se mantuvo durante 20 min. La temperatura de entrada de la inyección se ajustó a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ con una relación de flujo de 30:1. Durante las 48 horas de reacción de esterificación, más del 90 % de los lípidos de las algas podrían convertirse en ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel), y los principales componentes del biodiésel eran consistentes con los del aceite de algas derivados de la fermentación heterótrofa (véase Fig. 4).

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir biodiésel mediante un cultivo autótrofo a heterótrofo en dos pasos de *Chlorella*, caracterizado porque se usan células de microalgas con un contenido de lípidos superior al 50 %, obtenidas por cultivo autótrofo primero y a continuación cultivo heterótrofo, como materia prima para producir biodiésel; el método comprende los siguientes pasos: (1) cultivar de manera autótrofa *Chlorella*; (2) concentrar las células; (3) fermentar de manera heterótrofa; (4) recolectar y secar células de algas; (5) extraer lípidos de las células de algas secas; y (6) producir biodiésel por reacción de esterificación.
2. El método de producción de biodiésel mediante un cultivo autótrofo a heterótrofo de *Chlorella* en dos pasos de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la *Chlorella* son algas verdes de agua dulce *Chlorella protothecoides*.
3. El método de producción de biodiésel mediante un cultivo autótrofo a heterótrofo de *Chlorella* en dos pasos según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la *Chlorella* cultivada de manera autótrofa de dicha etapa (1) comprende: inocular las algas verdes de agua dulce *Chlorella protothecoides* en un matraz, estanque de cultivo o fotobiorreactor para incubar bajo luz, con una temperatura en el intervalo de 20-45 °C; glicina con una concentración inicial de 1 a 15 g·l⁻¹; un pH entre 5 y 9; una velocidad de circulación de aire entre 50 y 300 l/h; y 25-200 μmol·m⁻²·s⁻¹ de luz durante el proceso de cultivo, lo que da como resultado un crecimiento celular óptimo.
4. El método de producción de biodiésel mediante un cultivo autótrofo a heterótrofo de *Chlorella* en dos pasos según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el método para concentrar células en dicha etapa (2) es centrifugación a alta velocidad, floculación o filtración.
5. El método de producción de biodiésel mediante un cultivo autótrofo a heterótrofo de *Chlorella* en dos pasos según la reivindicación 1, **caracterizado por que** en la fermentación heterótrofa de dicha etapa (3), la densidad celular inicial se controla entre 5 y 100 g·l⁻¹, la temperatura es de 15 a 45 °C, la velocidad del flujo de aire es de 100 a 300 l/h y el pH se controla en el intervalo de 5,0 a 9,0 mediante la adición de una solución ácida o básica; la concentración de azúcar reductor en el caldo se mantiene en el intervalo de 1 a 40 g·l⁻¹ al complementar la fuente de carbono orgánico, la velocidad de agitación se controla para mantener la saturación de oxígeno en el caldo por encima del 10 %; se añade cloranfenicol o monofluoroacetato de sodio para evitar la posible contaminación microbiana durante el cultivo autótrofo y los procesos de concentración celular, la concentración final de cloranfenicol se encuentra entre 0,002 y 0,2 g·l⁻¹ y la concentración final de monofluoroacetato de sodio (MFA) se encuentra entre 0,1 y 100 mM.
6. El método de producción de biodiésel mediante un cultivo autótrofo a heterótrofo de *Chlorella* en dos pasos según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la composición de dicho medio autótrofo es: KH₂PO₄: 0,2 ~0,7 g·l⁻¹, K₂HPO₄: 0,1~0,4 g·l⁻¹, MgSO₄·7H₂O: 0,1~0,4 g·l⁻¹, FeSO₄·7H₂O: 0,1~3 mg·l⁻¹, glicina: 0,1-15 g·l⁻¹, vitamina B1: 0,001~0,1 mg·l⁻¹ y oligoelemento líquido A5 de 0,1~5 ml·l⁻¹, en donde el oligoelemento líquido A5 está formado por H₃BO₃: 2,86 g·l⁻¹, Na₂MoO₄·2H₂O: 0,039 g·l⁻¹, ZnSO₄·7H₂O: 0,222 g·l⁻¹, MnCl₂·4H₂O: 1,81 g·l⁻¹ y CuSO₄·5H₂O: 0,074 g·l⁻¹; la composición del medio heterótrofo es la misma que la anterior, excepto por la ausencia de glicina y la adición de una fuente de carbono orgánico para obtener una concentración inicial de azúcar reductor de entre 0,01 y 100 g·l⁻¹; durante el cultivo heterótrofo, la fuente de carbono orgánico se añade continuamente para mantener la concentración de azúcar reductor en el intervalo de 1-30 g·l⁻¹.
7. El método de producción de biodiésel mediante un cultivo autótrofo a heterótrofo de *Chlorella* en dos pasos según la reivindicación 1, **caracterizado por que** se añade una fuente de carbono orgánico al medio heterótrofo como azúcar reductor que incluye glucosa u otros monosacáridos, disacáridos o polisacáridos; comprendiendo la fuente de carbono orgánico glucosa, fructosa, hidrolizado de almidón de maíz, hidrolizado de almidón de yuca, hidrolizado de almidón de trigo o jugo de sorgo.

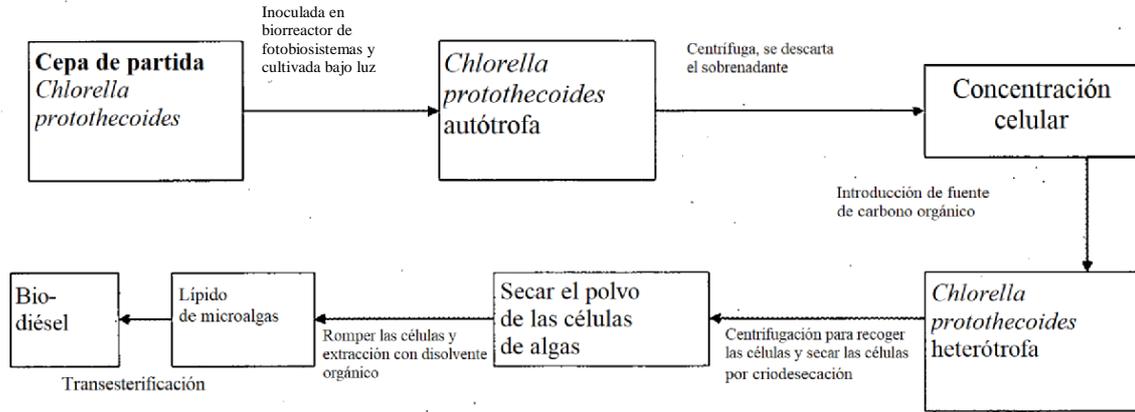


Fig.1

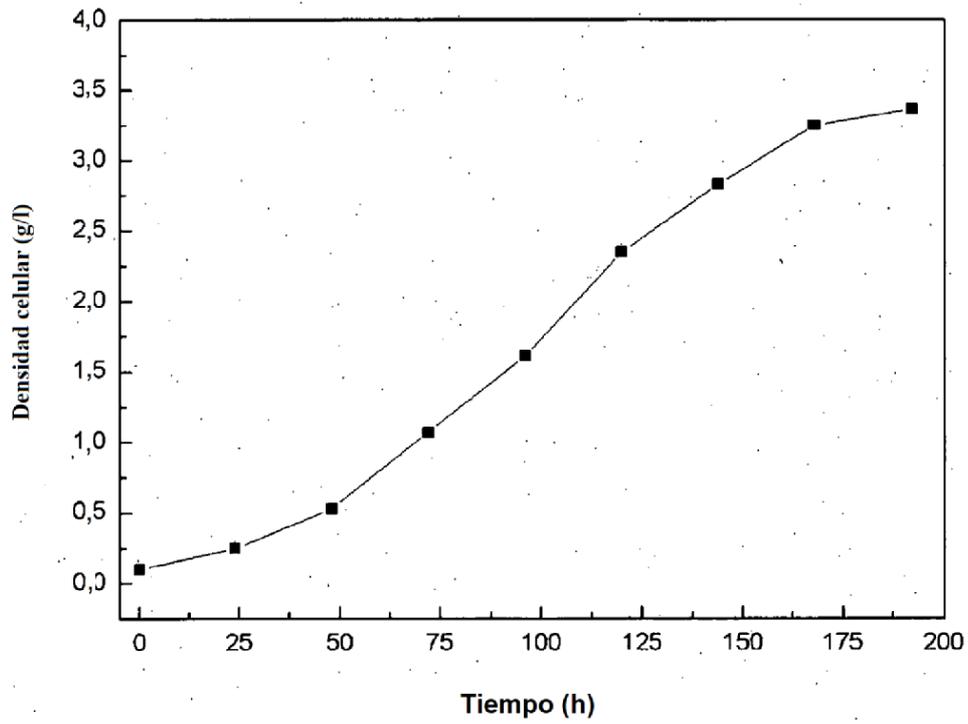


Fig.2

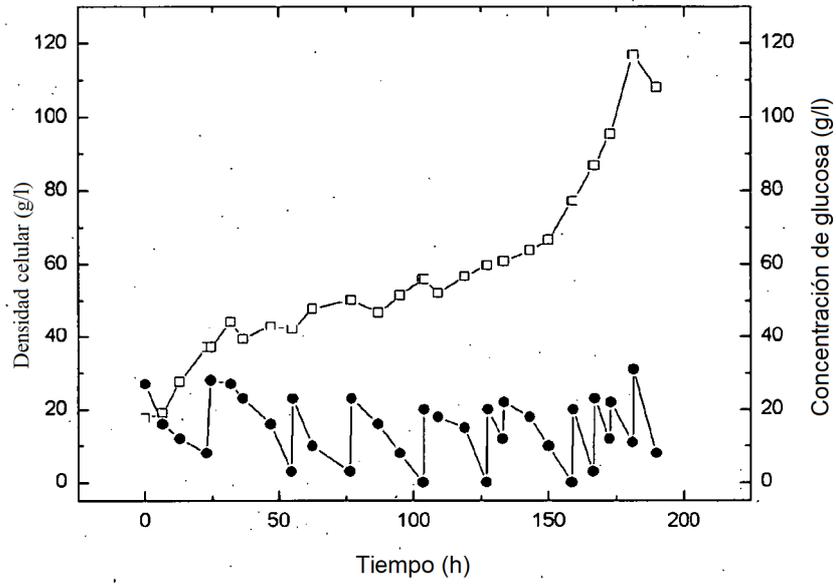


Fig.3

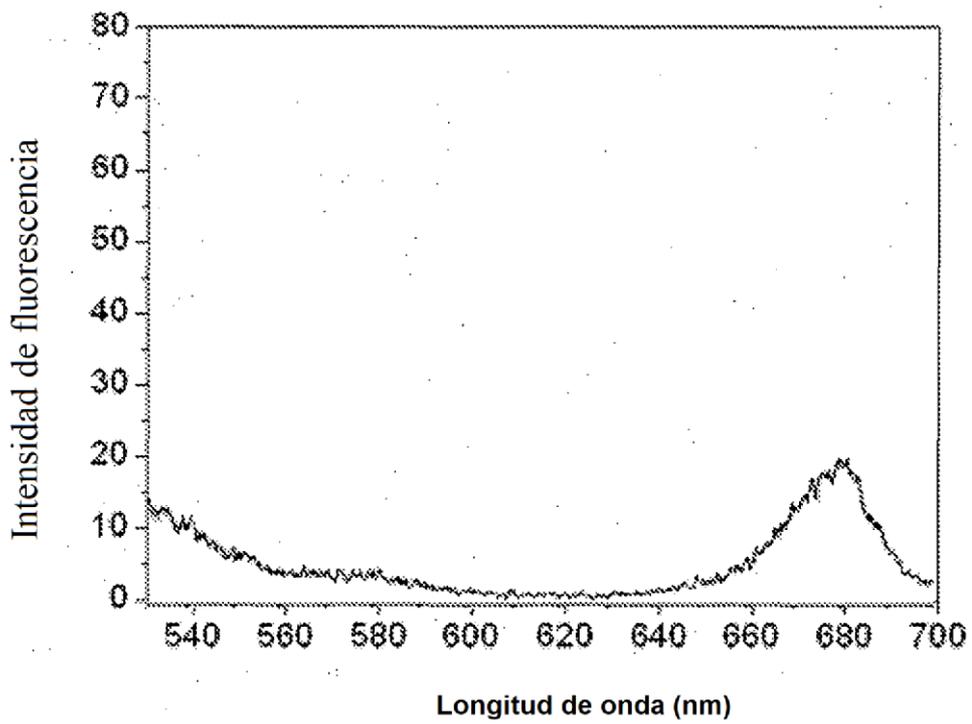
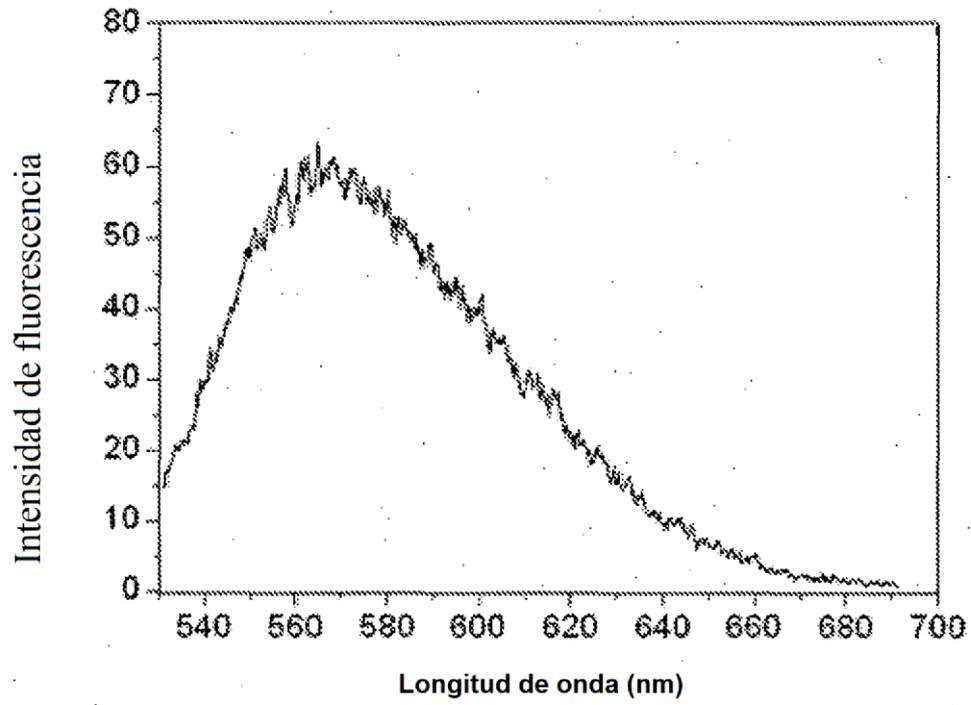


Fig.4