



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01373**

(22) Data de depozit: **09.12.2011**

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. **8/2013**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **ROVINARU CAMELIA,
CALEA FERENTARI NR.3, BL.75, ET.7,
AP.29, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **STILPEANU DANIELA LELIEANA,
BD. IULIU MANIU NR.53, BL.22A, SC.A,
AP.24, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GHIMIS SIMONA BIANCA,
ALEEA BOTORANI NR. 19, BL. V51, SC. A,
ET. 6, AP. 20, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **DRAGOȘ NICOLAE, STR. MUSCEL NR.4,
ET. 4, AP.9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **BICA ADRIANA, STR. FLORILOR NR. 164,
SC. 2, AP. 24, SAT FLOREȘTI,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **TULPINĂ DE SCENEDESMUS OPOLIENSIS ȘI PROCEDEU
DE OBȚINERE A ULEIULUI ALGAL PRIN CULTIVAREA
ACESTEIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o tulpină de *Scenedesmus opoliensis* și la un procedeu de cultivare a acesteia, pentru obținerea uleiului algal. Tulpina de *Scenedesmus opoliensis* AICB 141, cu număr de depozit la Culture Collection of Algae and ProtozoaCCPA 276/24 acumulează, într-un timp scurt, cantități mari de lipide care conțin resturi de acizi grași într-o cantitate adecvată, pentru transformarea în combustibil biodiesel, diesel și pentru aviație. Procedeu conform invenției constă în prepararea unui mediu de cultură BBM modificat, inocularea acestuia cu un mediu

cu suspensie de alge, cultivarea microalgelor timp de 10...12 zile, la o temperatură de 28...30°C, electro-flocularea suspensiei, filtrarea biomasei după perioada de cultivare, extracția ultrasonică a uleiului, evaporarea solventului și recuperarea cu randamente ridicate a uleiului algal, având o densitate, la 20°C, de 0,916...0,930g/cmc, un indice de aciditate de 0,31 mg/KOH/g și un indice de saponificare de 184...196 mg KOH/100 g.

Revendicări: 2



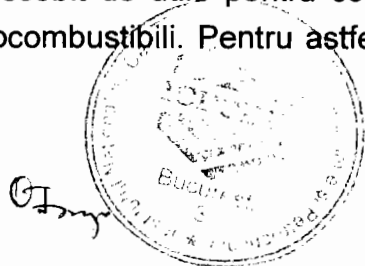
TULPINĂ DE *Scenedesmus OPOLIENSIS* ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ULEIULUI ALGAL PRIN CULTIVAREA ACESTEIA.

Prezentul brevet de invenție se referă la o tulpină de *Scenedesmus opoliensis*, destinată producerii de biomasă algală cu conținut ridicat de lipide prin sechestrarea bioxidului de carbon din emisii industriale, și la un procedeu de obținere a uleiului algal din biomasa de alge.

Sunt cunoscute tulpini de *Scenedesmus* destinate diferitelor utilizări practice. Cererea de brevet SUA 2009/0117223 descrie o tulpină aparținând unei noi specii, *Scenedesmus almerensis*, depozitată la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) cu numărul de depozit CCAP 276/24. Tulpina acumulează până la 0,5% luteină în biomasa uscată și este caracterizată printr-o rată de creștere de 0,8 g / litru mediu / zi, atunci când este cultivată la temperatura de 30°C și pH 8,0, pe un mediu suplimentat cu vitamine. Din această tulpină s-a revendicat obținerea unui ulei algal bogat în acizi grași polinesaturați și în luteină, prin procedee chimice uzuale de extracție.

Cererea de brevet SUA 2011/0076749 prezintă o tulpină de *Scenedesmus producto-capitatus*, depozitată sub numărul KCTC 11336BP la Korean Collection for Type Culture (KCTC). Tulpina a fost cultivată pe mediu BG-11, barbotată cu amestecuri de gaze cu un conținut de până la 10% CO₂, și cu gaze de ardere cu 10% CO₂, în ciclu 12 ore lumină / 12 ore întuneric. În cazul barbotării cu amestec de gaze conținând peste 5% bioxid de carbon autorii cererii de brevet SUA 2011/0076749 au constatat ne-exprimarea carbonic anhidrazei, enzima care catalizează reacția dintre bioxidul de carbon și apă, cu formarea ionilor carbonat/ bicarbonat utilizabili în fotosinteza algală. Întrucât concentrațiile de peste 5% bioxid de carbon în amestecul de gaze barbotat prin mediul BG-11 reprezintă exprimarea carbonic anhidrazei, autorii au considerat necesară suplimentarea mediului BG-11 cu lizat de microalge *Scenedesmus producto-capitatus*, cultivate pe medii aerate cu un conținut mai redus de bioxid de carbon, care să reprezinte o sursă de carbonic anhidrază. Tulpina a prezentat o rată a fixării bioxidului de carbon de 0,091 ... 0,454 mmol / litru mediu cultură / hr, fără diferențe semnificative în cazul aerării cu amestecuri sintetice de gaze îmbogățite în CO₂ sau cu gaze de ardere cu conținut de NO_x și SO_x. Autorii au interpretat rezultatele ca demonstrând rezistența tulpinii la NO_x și SO_x și revendică această rezistență pentru tulpina KCTC 11336BP.

Nu s-au descris până în prezent tulpini de *Scenedesmus* care să acumuleze cantități ridicate de lipide, în perioade relativ scurte de timp. Astfel de tulpini ar fi deosebit de utile pentru conversia bioxidului de carbon din emisiile industriale în biocombustibili. Pentru astfel de aplicații ar fi de dorit și o structură a resturilor de



acizi grași în uleiul algal care să permită randamente ridicate la transformarea în biodiesel, diesel regenerabil, combustibil pentru motoarele de aviație.

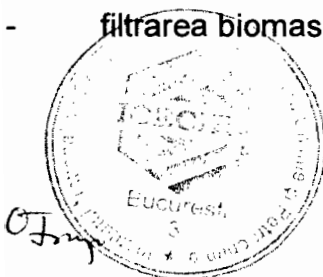
Pentru exprimarea potențialului de acumulare de lipide adecvate transformării în biocombustibil este necesară dezvoltarea unui procedeu de cultivare a tulpinii algale, de recoltare a biomasei de microalge din mediul de cultură și de extragere a uleiului algal, adaptat tulpinii de *Scenedesmus*. Cererea de brevet SUA 2011/0138682 se referă la un procedeu de cultivare a tulpinilor de *Scenedesmus*, pentru obținerea de lipide / ulei algal și / sau fitonutrienți ca astaxantina și beta-carotenul. Acest procedeu implică cultivarea în bazine deschise, în care pH-ul se menține la valori de peste 8,5, iar temperatura mai mare de 33°C. Astfel de condiții sunt dificil de realizat în zonele din Europa, inclusiv în cele din România.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este referitoare la o tulpină de *Scenedesmus* care acumulează cantități ridicate de lipide într-un timp scurt, și la dezvoltarea unui procedeu de obținere a uleiului algal prin cultivarea acestei tulpini.

Tulpina de *Scenedesmus opoliensis* AICB 141, depozitată la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) cu numărul de depozit CCAP 276/24, acumulează 43...45% lipide în biomasă, cu un conținut de 87... 89% esteri ai acizilor grași C16, C18 și C18:1, la o viteză de creștere de 0,6...0,7 g biomasă / litru mediu / zi, corespunzător unei acumulări de lipide de 250...315 mg / litru mediu / zi, cu o rată de fixare a bioxidului de carbon de 1 ...1,1 mmoli CO₂/ litru mediu / oră și cu un timp de dublare de 2,027 zile.

Procedeu de obținere a uleiului algal prin cultivarea tulpinii *S. opoliensis* AICB 141 este alcătuit din următoarele etape:

- prepararea unui mediu de cultură BBM, modificat prin suplimentare cu bicarbonat de sodiu până la 2 g/l și azotit de sodiu până la 2 g/l;
- inocularea mediului cu suspensie algală în mediu BBM suplimentat cu bicarbonat de sodiu, 10⁶ufc/ml, în raport de 1 parte inocul la 9 părți mediu axenic;
- cultivarea micro-algelor timp de 10..12 zile, la o temperatură de lucru: 28 – 30°C, la o intensitatea radiației fotosintetice de 240 μeinsteini / m² /s și prin barbotarea unui amestec sintetic de gaze conținând 7% CO₂, la un debit de 20 ml/min;
- electroflocularea suspensiei algale prin aplicarea unei tensiuni continue de 19 V, la o intensitate a curentului de 0,85A, pe un catod de cărbune polarizat față de un anod din aliaj de fier (oțel-carbon);
- filtrarea biomasei algale floculate pentru înlăturarea suplimentară a apei;



25

- extracția ultrasonică, timp de 15 min la 35 kHz, a uleiului algal cu un amestec cloroform : metanol (1:2), aplicat în raport 22,5 părți biomasă uscată la 15 părți solvent;

- evaporarea și recuperarea solventului și separarea uleiului algal.

Tulpina de *Scenedesmus opoliensis* AICB 141 are următoarele avantaje:

- Rezistență la contaminare în cazul cultivării industriale pe mediu BBM suplimentat cu bicarbonat de sodiu datorită timpului scurt de dublare;

- Capacitate ridicată de a sechestra cantități semnificative de CO₂ cu acumulare de lipide;

- Conversie fotosintetică ridicată a bioxidului de carbon în esteri ai acizilor grași C16, C18 și C18:1 încorporați în lipide, într-o proporție convenabilă transformării în biodiesel (prin transesterificare), diesel din surse regenerabile (prin hidroliza grăsimilor, separarea și decarboxilarea acizilor grași și hidrogenarea amestecului de hidrocarburi rezultat) și combustibili pentru aviație (prin hidroprocesarea acizilor grași pentru producerea kerosenului parafinic sintetic).

Procedeul de obținere a uleiului algal prin cultivarea tulpinii *S. opoliensis* AICB 141 prezintă următoarele avantaje:

- Facilitarea fixării bioxidului de carbon datorită suplimentării mediului BBM cu bicarbonat de sodiu, care accelerează reacția bioxidului de carbon cu apa și formarea anionilor de carbonat / bicarbonat, utilizați de microalge în procesul de fotosinteză;

- Reducerea consumului de energie prin optimizarea recoltării biomasei algale datorită utilizării procedurii de electrofloculare a suspensiei algale;

- Extracția cu randamente ridicate a uleiului algal din biomasa umedă, prin utilizarea unor solvenți cu polaritate ridicată, amestec de cloroform: metanol (1:2) și a extracției ultrasonice.

Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.

Exemplu. Tulpina de *Scenedesmus opoliensis* AICB 141 a fost izolată din apă dulce, Lacul Știucii, jud. Cluj. Tulpina AICB 141 este organizată cenobial, cenobiile mature, plane, fiind formate din 2-4 celule, mai rar 8 celule. Cenobiul tipic constă din 4 celule alipite prin straturile interne ale peretelui celulelor componente. Frecvența cenobiilor tetradesmoide sau a celor didesmoide este variabilă, în funcție de condițiile de creștere. În culturile suplimentate cu dioxid de carbon și cu limitare nutrițională prin sursele de N și P, cenobiile didesmoide sunt mai frecvente, însoțite și de forme monodesmoide. În condiții normale de creștere nu formează înveliș mucilaginos. Stratul extern subțire al peretelui celular, vizibil în microscopie optică, este conținut învelișele toate celulele cenobiului și poate fi observat cu ușurință mai ales la cenobiile tinere. Celulele cenobiilor didesmoide precum și celulele



externe (terminale) ale celor tetrademoide sunt prevazute cu câte o pereche de spini polari drepti, uneori mai mult sau mai puțin curbați, care pot depăși ca lungime jumătatea cenobiilor tetrademoide. Grosimea spinilor este variabilă, frecvent mai groși la celulele îmbătrânite. La acestea din urmă spinii se pot rupe, partea distală fiind eliberată în mediul de creștere. Celulele interne ale cenobiilor tetrademoide sunt cilindrice, cu polii rotunjiți. Dimensiunile celulelor sunt variabile: 18,4–(20,2)-25,9 μm lungime, respectiv 5,5-(6,8)-9 μm lățime. Celulele pot prezenta ornamentații suplimentare, denumite rozete, câte 2-4 pe fiecare celulă. Stratul extern al peretelui celular, care învelește lax întregul cenobiu, are o structură fină de rețea formată din subunități hexagonale, vizibile în microscopia electronică de baleiaj / scanning (SEM). Cloroplastul unic este dispus parietal în fiecare celulă, cu câte un pirenoid foarte vizibil în microscopia optică. Tulpina se reproduce prin formarea de autospori rezultați în urma a 2 diviziuni succesive.

Tulpina AICB a fost cultivată inițial pe mediu BBM, a cărei formulă este prezentată în tab.1.

Tab. 1. Compoziția mediului nutritiv BBM

Componente	Concentrația (g/l)
NaNO ₃	0,250
KH ₂ PO ₄	0,175
K ₂ HPO ₄	0,075
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,025
NaCl	0,025
KOH 85%	0,031
Soluție de microelemente	1 ml
Soluție de Fe chelatat	1 ml
Componente soluție stoc microelemente	Concentrația (g/l)
H ₃ BO ₃	2,860
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2,030
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,222
MoO ₃ (85%)	0,018
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,079

Creșterea tulpinii s-a realizat apoi în serii experimentale cu concentrații crescătoare de NaHCO₃ între 3-10 g/L adăugate în mediul standard BBM. Rezultatele experimentului au fost comparate cu cele obținute în condițiile creșterii pe mediul standard BBM, nemodificat. Condițiile experimentale de lucru au fost: temperatura de lucru 28°C, intensitatea luminii albe 240 μE/m²s. Datele experimentale înregistrate pe parcursul creșterii tulpinii *Scenedesmus opoliensis* AICB sunt prezentate în tab. 2.



Tab. 2. Creșterea tulpinii *Scenedesmus opoliensis* AICB 141 în mediu nutritiv BBM suplimentat cu NaHCO₃

Ziua	BBM + 0,25 g/l NaHCO ₃			BBM + 3 g/l NaHCO ₃			BBM + 7 g/l NaHCO ₃			BBM + 10 g/l NaHCO ₃		
	OD	pH	T	OD	pH	T	OD	pH	T	OD	pH	T
0	0,17	7,01	27,8	0,20	8,23	28,0	0,12	8,27	28,0	0,18	8,80	28,2
1	0,18	6,15	27,5	0,24	7,63	27,9	0,17	8,00	28,0	0,07	8,21	28,5
2	0,22	5,77	27,9	0,46	7,53	27,7	0,36	8,07	28,0	0,05	8,15	27,7
3	0,34	6,06	28,2	0,76	7,57	28,2	0,65	7,96	28,0	0,08	8,13	27,5
4	0,45	6,40	28,5	0,97	7,62	27,9	0,88	7,97	27,8	0,13	8,12	27,7
5	0,65	6,30	28,0	1,21	7,79	27,6	1,10	7,96	27,8	0,29	8,11	28,0
6	0,88	6,39	27,7	1,47	7,69	27,8	1,39	7,97	27,9	0,35	8,10	28,2
7	1,12	6,43	27,2	1,61	7,64	28,0	1,73	7,96	27,9	0,37	8,10	28,5
8	1,22	6,40	27,6	1,75	7,61	28,1	1,94	7,91	27,8	0,36	8,10	28,3
9	1,35	6,39	28,0	1,93	7,54	28,2	2,22	7,89	28,0	-	-	-
10	1,46	6,38	28,2	1,98	7,66	27,9	2,21	7,88	28,0	-	-	-
11	1,54	6,38	28,5	2,00	7,59	27,8	2,23	7,89	27,8	-	-	-
12	1,55	6,30	28,0	1,99	7,64	28,0	2,23	7,88	27,9	-	-	-
13	1,54	6,38	28,3	1,98	7,60	28,0	2,21	7,88	28,2	-	-	-
14	1,53	6,36	28,1	1,98	7,60	27,9	2,20	7,88	28,1	-	-	-

OD-densitatea optica; T-temperatura

Datele din tab. 2 demonstrează că se obține o creștere progresivă a ratei de dezvoltare a algelor, exprimată prin $\Delta \log_2$ OD, direct proporțională cu concentrația de NaHCO₃, în domeniul tolerat de concentrație al NaHCO₃ de la 0,25 g/l până la 7 g/l. Peste această concentrație a NaHCO₃, de 7 g/l, are loc o inhibare puternică a creșterii algelor și moartea celulelor algale (care a fost observată la microscopie optică).

Mediul BBM a fost suplimentat și cu NaNO₃, întrucât studiile efectuate au demonstrat dependența ratei de acumulare de biomasă de sursa de azot disponibilă. S-a lucrat cu mediu BBM modificat prin suplimentare cu bicarbonat de sodiu până la 2 g/l și azotit de sodiu până la 2 g/l.

Tulpina *S. opoliensis* AICB 141 a fost multiplicată în mediu BBM modificat, prin utilizarea unui fotobioreactor Fotobiostat PBR – 2S Sartorius, Germania, care a fost umplut axenic cu mediu BBM suplimentat, steril și inoculat cu inocul realizat pe mediu nutritiv BBM modificat, obținut prin cultivare în pahare Erlenmeyer aerate prin agitare la temperatura ambiantă.

Condițiile de creștere asigurate în fotobioreactor au fost: a) volumul suspensiei algale: 3 l; b) temperatura de lucru: 25 – 30°C; c) radiația activă fotosintetizatoare (PAR): 400-700 nm; d) fluxul luminos: 500-1000 lm; e) Intensitatea luminii (iradianța): 120 - 240 $\mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$; f) barbotarea de amestec sintetic de gaze cu compoziția: 7% CO₂, 14% O₂ și 79% N₂ la un debit de 20 ml/min.



Fotobioreactorul s-a utilizat în sistem semicontinuu turbidostat. Operarea fotobioreactorului a avut loc după următorul program: (i) s-a pornit fotobioreactorul în sistemului "șarjă" și s-au continuat toate operațiile standard până când suspensia de biomasă a ajuns la finele fazei exponențiale; (ii) s-a trecut fotobioreactorul în regimul de operare turbidostat, ceea ce înseamnă că turbiditatea (OD) a devenit parametru de referință menținut la o valoare constantă prin programul fotobioreactorului, care comanda pornirea / oprirea pompei de alimentare a fotobioreactorului cu mediu nutritiv proaspăt, respectiv pompa de ieșire, care comandă scoaterea de suspensie algală din fotobioreactor. Astfel, în regimul turbidostat fotobioreactorul funcționează ca un reactor continuu cu agitare în regim staționar. Media zilnică a suspensiei microalgale extrase din turbidostat a fost de 300 ml. În suspensia de alge s-au determinat lipidele prin analiză termogravimetrică.

În aceste condiții de lucru s-a determinat o viteză exponențială de creștere: de 0,342 zile⁻¹, un timp de dublare 2,027 zile, 43...45% lipide în biomasă, la o viteză de creștere de 0,6...0,7 g biomasă / litru mediu / zi, corespunzător unei acumulări de lipide de 250...315 mg / litru mediu / zi, cu o rată de fixare a bioxidului de carbon de 1 ... 1,1 mmoli CO₂ / litru mediu / oră.

Rezultatele obținute demonstrează faptul că tulpina de *Scenedesmus opoliensis* AICB 141 prezintă caracteristici superioare față de cele revendicate pentru alte tulpini. Tulpina *Scenedesmus producto-capitatus*, depozitată sub numărul KCTC 11336BP, și protejată prin cererea de brevet SUA 2011/0076749 prezintă o rată a fixării bioxidului de carbon de 0,091 ... 0,454 mmol / litru mediu cultură / hr. Cererea de brevet SUA 2011/0091945 se referă la un procedeu prin care se stimulează acumularea de lipide în celulele unor tulpini algale, de la 13,4 mg/l până la 58,4 mg/l.

Algele s-au recoltat din mediul de cultură prin electrofloculare. Aceasta s-a realizat prin aplicarea unei tensiuni continue de 19 V, la o intensitate a curentului de 0,85A, pe un catod de cărbune polarizat față de un anod din aliaj de fier (oțel-carbon), amplasat într-o coloană de suspensie. Ionii de Fe rezultați prin electroliză, ca și bulele de oxigen format pe suprafața anodului au determinat separarea biomasei algale. Înlăturarea suplimentară a apei s-a realizat prin filtrarea biomasei algale. Din biomasa umedă uleiul algal a fost extras ultrasonic timp de 15 min la 35 kHz, cu un amestec cloroform : metanol (1:2), aplicat în raport 22,5 părți biomasă uscată la 15 părți solvent. În final s-a procedat la evaporarea și recuperarea solventului și la separarea uleiului algal.

Caracteristicile fizico-chimice ale uleiului algal de *S. opoliensis* AICB 141 sunt prezentate în tab. 3.



Tab. 3. Caracteristicile fizico-chimice ale uleiului algal de *Scenedesmus opoliensis* AICB 141.

Nr. crt.	Caracteristici fizico - chimice	U.M.	Valoare
1.	Aspect, la 20°C	-	lichid limpede, fara sedimente
2.	Densitatea la 15°C	g/cm ³	0,916-0,930
3.	Indice de aciditate	mg KOH/g	0,31
4.	Continut de cenusa	%	0,054
5.	Continut de apa	%	0,12
6.	Indice de iod	g I/100g	112-120
7.	Indice de saponificare	mgKOH/100g	184-196

In uleiul algal s-a determinat compoziția de acizi grași prin analiza gaz-cromatografică a esterilor metilici. In tab. 4 este prezentată compoziția de acizi grași din uleiului de *S. opoliensis* AICB 141.

Tab. 4. Compoziția acizilor grași din uleiului de *S. opoliensis* AICB 141

Denumire acid	Concentratie %
C16:0	35,71
C16: 1 trans	1,02
C16:1 cis	0,34
C18:0	6,32
C18:1 trans	0
C18:1 cis	45,42
C18:2 cis	0
C18:2 trans	2,97
C18:3n6	0,08
C18:3n3	0,35
C18:3n4	0,32

Proporția de peste 87% acizi grași C16, C18 și C18:1 este convenabilă transformării în biodiesel (prin transesterificare), diesel din surse regenerabile (prin hidroliza grăsimilor, separarea și decarboxilarea acizilor grași și hidrogenarea amestecului de hidrocarburi rezultat) și combustibili pentru aviație - prin hidroprocesarea acizilor grași pentru producerea kerosenului parafinic sintetic.



TULPINĂ DE SCENEDESMUS OPOLIENSIS ȘI PROCEDU DE OBTINERE A ULEIULUI ALGAL PRIN CULTIVAREA ACESTEIA.

Revendicări

1. Tulpina de *Scenedesmus opoliensis* AICB 141 caracterizată prin aceea că este depozitată la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) cu numărul de depozit CCAP 276/24, acumulează 43...45% lipide în biomasă, cu un conținut de 87... 89% esteri ai acizilor grași C16, C18 și C18:1, la o viteză de creștere de 0,6...0,7 g biomasă / litru mediu / zi, corespunzător unei acumulări de lipide de 250...315 mg / litru mediu / zi, cu o rată de fixare a bioxidului de carbon de 1 ...1,1 mmoli CO₂/ litru mediu / oră și cu un timp de dublare de 2,027 zile.
2. Procedul de obținere a uleiului algal prin cultivarea tulpinii *S. opoliensis* AICB 141 CCAP 276/24 caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: prepararea unui mediu de cultură BBM, modificat prin suplimentare cu bicarbonat de sodiu până la 2 g/l și azotit de sodiu până la 2 g/l; inocularea mediului cu suspensie algală în mediu BBM suplimentat cu bicarbonat de sodiu, 10⁶ufc/ml, în raport de 1 parte inocul la 9 părți mediu axenic; cultivarea micro-algelor timp de 10..12 zile, la o temperatură de lucru: 28 – 30°C, la o intensitatea radiației fotosintetice de 240 μeinsteini / m² /s și prin barbotarea unui amestec sintetic de gaze conținând 7% CO₂, la un debit de 20 ml/min; electroflocularea suspensiei algale prin aplicarea unei tensiuni continue de 19 V, la o intensitate a curentului de 0,85A, pe un catod de cărbune polarizat față de un anod din aliaj de fier; filtrarea biomasei algale flocluate pentru înlăturarea suplimentară a apei; extracția ultrasonică, timp de 15 min la 35 kHz, a uleiului algal cu un amestec cloroform : metanol, 2:1, aplicat în raport 22,5 părți biomasă uscată la 15 părți solvent; evaporarea și recuperarea solventului și separarea uleiului algal.

