



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00330**

(22) Data de depozit: **30.04.2014**

(41) Data publicării cererii:  
**29.05.2015** BOPI nr. **5/2015**

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

(72) Inventatori:  
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,  
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,  
B, RO;**  
• **STEPAN EMIL, BD.TIMIȘOARA NR.49,  
BL.CC6, SC.A, ET.3, AP.12, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **ILIE LUCIA, BD. TIMIȘOARA NR. 49,  
BL.Cc6, SC. A, ET. 4, AP. 14, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE CULTIVARE CONTINUĂ A MICROALGELOR,  
ÎN CICLU AUTOTROF - MIXOTROF, CU RECICLAREA APEI  
ȘI A NUTRIENȚILOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de cultivare a algelor, cu obținerea unui biocombustibil, biocărbune, și a unui extract de alge cu acțiune complexă asupra plantelor de cultură. Procedeu conform invenției constă în cultivarea continuă a microalgelor într-un sistem de două fotobio-reactoare operate în cascadă, în ciclu autotrof-mixotrof, separarea biomasei algale cultivată de mediile de cultură prin electro-flocurare și flotație, extragerea lipidelor care, în continuare, se supun transesterificării la biocombustibil, iar mediul lichid recuperat se amestecă cu glicerina brută recuperată, și cu hidrolizatele de biomasă autotrofă, din care rezultă un amestec care se

utilizează pentru cultivarea mixotrofă a algelor, din care biomasa rezistentă la hidroliza enzimatică se transformă în biocărbune utilizat pentru purificarea mediului lichid recuperat, acesta fiind în continuare completat cu nutrienți minerali, și utilizat în proces, iar în final, din biomasa mixotrofă rezultă un extract enzimatic cu acțiune complexă asupra plantelor de cultură.

Revendicări: 11

Figuri: 1



## PROCEDEU DE CULTIVARE CONTINUĂ A MICROALGELOR, ÎN CICLU AUTOTROF – MIXOTROF, CU RECICLAREA APEI ȘI A NUTRIENȚILOR

Prezenta invenție se referă la un procedeu de cultivare continuă a micro-algelor, într-un sistem de două fotobioreactoare operate în cascadă, în ciclu autotrof – mixotrof, prin care se asigură recircularea apei și a unei părți din nutrienți, cu producerea din biomasă algală, de biocombustibili, biocărbune utilizabil ca ameliorator de sol, și extracte de alge cu o acțiune complexă asupra plantelor de cultură, de stimulare a creșterii și dezvoltării și de protejare față de stresurile biotice și abiotice.

Sunt cunoscute diferite procedee de cultivare continuă a micro-algelor, cu recircularea apei și a unei părți din nutrienți, prin care se urmărește creșterea eficienței procesului de fotosinteză algală și reducerea impactului global asupra mediului al procedeelelor de fixare durabilă a bioxidului de carbon cu ajutorul micro-algelor. Cererea de brevet WO2011/127167 se referă la un procedeu de deshidratare a unei culturi de celule de microalge umede, cu recircularea apei rezultate. Procedeu include următoarele etape: îndepărtarea cel puțin a unei porțiuni de lichid într-o cultură de celule de alge, folosind un filtru tubular din metal sinterizat, pentru a obține o fracție umedă, reprezentând biomasa de alge cu un conținut de lichid semnificativ mai mic decât cel al culturii inițiale de micro-alge; reciclarea unei părți din lichidul scos din cultura de microalge pentru a fi utilizat într-o altă cultură de celule de alge; adăugarea unui amestec de solvenți miscibil cu apa peste biomasa de alge pentru a coagula micro-algele și pentru a extrage o parte din compușii de interes; separarea algelor coagulate deshidratate de amestecul de solvenți. Amestecul de solvenți folosit este un amestec care are o diferență de densitate de cel puțin 10% față de cea a apei, fiind alcătuit din glicoli, glicerină, acetonă, acetonitril și alcooli.

Procedeu nu include etape prin care să se asigure reciclarea altor nutrienți, în afara celor reziduali din mediul de cultură, și prin care să se elimine diferitele produse de metabolism care se acumulează în mediul de cultivare a microorganismelor fototrofe. Metaboliții organici care se acumulează în mediul de cultură sunt natural excretați de alge în timpul creșterii (Yu *et al.*, 2012, Bioresource Technology, 110: 184–189) sau atunci când celulele sunt lizate ca o consecință a expunerii la diferite forme de stres (Harun *et al.*, 2010 Renewable and

Sustainable Energy Reviews, 14: 1037–1047). Unii dintre acești compuși, ca de exemplu acizii grași și produșii lor de (per)oxidare, sunt toxici pentru micro-alge (Bosma *et al.*, 2008, *Biotechnology and Bioengineering*, 101: 1108–1114). Atunci când mediul de cultură este recirculat, metaboliții organici tind să se acumuleze determinând reduceri ale productivității în biomasă (Rodolfi *et al.*, 2003, *Biomolecular Engineering*, 20: 243–248). De asemenea, atunci când mediul de cultură este recirculat, și contra-ionii sărurilor minerale folosite ca sursă de nutrienți (de ex.  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), tind să se acumuleze, determinând o modificare a salinității mediului de cultură, care influențează negativ creșterea microalgelor (Alyabyev *et al.*, 2007 *Thermochimica Acta*, 458: 65–70).

O categorie specială de compuși organici care se acumulează în mediul de cultură al micro-algelor sunt particulele de exopolimer transparente (Transparent exopolymer particles -TEPs), care au un rol determinant în dezvoltarea fotobiofilmelor (Bar-Zeev *et al.*, 2012, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 9119-9124). Formarea acestor fotobiofilme pe suprafețele transparente ale fotobioreactoarelor reduce eficiența iluminării și favorizează infecțiile bacteriene (Singh și Sharma, 2012, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16: 2347-2353).

Pentru a reduce riscul formării fotobiofilmelor pe suprafețele transparente ale fotobioreactoarelor au fost dezvoltate diferite tipuri de acoperiri, translucide și (super)hidrofobe, pentru materialele (plastice) transparente folosite la confecționarea pereților fotobioreactoarelor. Brevetul FR2941237 prezintă un material transparent, care include un strat pe bază de polimer metacrilic și un strat care include cel puțin un aditiv antifouling hidrofob. Cererea de brevet DE102009028338 se referă la o acoperire translucidă cu un strat siliconic superhidrofob, care este alcătuită din elastomeri siliconici, condensati și/sau reticulați, polimeri hibridi siliconici, rășini siliconice și geluri siliconice, și care are un unghi de contact cu apa de cel puțin 100 grade.

Folosirea unor astfel de acoperiri cu hidrofobicitate ridicată modifică însă regimul de curgere al fotobioreactoarelor cu circulație continuă a mediului de cultură, cum sunt de ex. cele tubulare. Curgerile turbulente rezultate ca urmare a folosirii unor astfel de suprafețe determină o creștere a consumurilor energetice necesare pentru recircularea mediului de cultură.

Eliminarea din mediile de cultură a TEPs, care sunt precursorii formării fotobiofilmelor pe pereții transparenți ai fotobioreactoarelor, ar reduce semnificativ rata de formare a acestor fotobiofilme care influențează negativ randamentul culturilor de micro-alge și care cresc riscul infecțiilor.

Micro-algele au capacitatea de a se dezvolta mixotrof, pe medii care includ nu numai componente minerale, ci și surse organice de carbon, azot și fosfor. Cererea de brevet WO 2010/123848 dezvăluie un procedeu care implică formarea unei culturi algale, prin combinarea unor populații de alge care au capacitatea de a crește pe ape industriale uzate, cu un mediu cu ape industriale uzate, suplimentat opțional cu o sursă de carbon reprezentată de glucoză, zaharoză, fructoză, glicerol, metanol, acetat sau hidrolizat lignocelulozic, ca și de orice altă combinație a acestora.

Cererea de brevet WO2012/035262 descrie un procedeu mixotrof de cultivare a algelor în prezența unei surse de lumină discontinuă, sub formă de flash-uri. Mediul de creștere este suplimentat cu diferite surse de carbon: 5 mM acetat, 5 g/l glucoză, 10 g/l lactoză, 10 g/l zaharoză și 5 g/l glicerol. Flash-urile de lumină, care sunt între 20 și 30 pe oră, au amplitudine egală sau superioară la 10 pEm-2s-1, și o durată cuprinsă între 20 secunde și 10 minute, de preferat între 10 secunde și 2 minute, și cel mai preferat între 20 secunde și 1 minut. Prin acest procedeu se acumulează cantități de biomasă cuprinse între 100 și 150 g/l, cu un conținut de lipide cu peste 30% mai ridicat decât cel din celulele acelorași alge cultivate autotrof, iar timpul de cultivare se reduce la mai puțin de 40 ore.

Cererea de brevet SUA 2013/0217084 descrie un procedeu de cultivare mixotrofă a algelor pe medii suplimentate cu 30 g/l glicerină brută de la fabricarea biodieselului și 10 g/l extract de drojdie, prin care se obține biomasă de alge unicelulare cu un conținut ridicat de acizi grași omega-3.

Un dezavantaj comun al procedeelor descrise până în prezent este faptul că suplimentarea mediului de cultură mineral autotrof se realizează prin adăugarea de compuși care provin din fotosintetizatului organismelor terestre, în condițiile în care această suplimentare s-ar putea realiza prin reutilizarea unor compuși proveniți din prelucrarea biomasei algale, recoltată inclusiv din medii mixotrofe suplimentate cu surse de carbon, azot și fosfor provenite din biomasă de alge unicelulare. Un alt dezavantaj este dat de faptul că suplimentarea se realizează predominant cu surse de carbon, în condițiile în care deficitul principal

în producerea comercială de biocombustibili din micro-alge este cel al surselor de azot și fosfor – a se vedea de ex. review-ul Chisti, 2013, J. Biotech., 167:2012-214.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este aceea de a dezvolta un procedeu de cultivare continuă, în ciclul autotrof-mixotrof, cu recircularea apei și a nutrienților, care să includă etape prin care să se realizeze purificarea mediului lichid recirculat de compuși organici care pot avea efecte dăunătoare asupra productivității culturii de microalge, inclusiv TEPs care favorizează formarea de fotobiofilme.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu de cultivare mixotrofă a algelor unicelulare, în care sunt utilizați, pentru suplimentarea mediului de cultură mixotrof, compuși proveniți din prelucrarea biomasei algale procesate pentru obținerea de biocombustibili, respectiv glicerina brută, rezultată de la transesterificarea lipidelor algale, ca sursă de carbon, și hidrolizatele enzimatiche de proteine și acizi nucleici din biomasa de alge unicelulare cultivată autotrof, ca sursă de azot și fosfor.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu prin care se obțin hidrolizatele de proteine și acizi nucleici din biomasa de alge unicelulare cultivată autotrof, folosite pentru suplimentarea mediului mixotrof.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu prin care, din biomasa de microalge cultivate mixotrof, să se obțină un extract enzimatic cu acțiune complexă asupra plantelor de cultură, de activare a rezistenței la stresurile biotice și abiotice și de stimulare a proceselor de creștere și dezvoltare.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Cultivarea autotrofă a micro-algelor, într-un fotobioreactor tubular, pe un mediu mineral, care include, după primul ciclu, mediu lichid recirculat F2;
- ✓ Recoltarea biomasei de alge cultivate pe mediu autotrof prin electro-floculare și flotație, cu recuperarea mediului lichid F1 și utilizarea acestuia pentru mediul lichid mixotrof de cultivare a micro-algelor;
- ✓ Ruperea celulelor de microalge separate prin flotație prin omogenizare la înaltă presiune;
- ✓ Extragerea lipidelor din omogenizatului de micro-alge, prin folosire de solvenți organici, urmată de recuperarea prin distilare a solvenților și separarea lipidelor;

- ✓ Trans-esterificarea lipidelor, cu recuperarea glicerinei brute care este utilizată, după aducere la pH neutru cu acid fosforic, ca sursă de carbon pentru suplimentarea mediului mixotrof de cultivare a algelor, în concentrație de 2 g/l;
- ✓ Hidroliza enzimatică a biomasei delipidizate cu un amestec de hidrolaze, fosfataze, nucleaze, proteaze și amidopeptidaze;
- ✓ Separarea prin centrifugare la 8.000 x g a materialului micro-algal rezistent la hidroliză enzimatică M1, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, și prelucrarea ulterioară a acestui material la bio-cărbune;
- ✓ Normalizarea hidrolizatului de proteine și acizi nucleici prin ultrafiltrare tangențială;
- ✓ Cultivarea algelor unicelulare pe mediu mixotrof, obținut prin suplimentarea mediului mineral F1 recuperat, cu glicerină brută și hidrolizate de proteină și acizi nucleici micro-algali;
- ✓ Recoltarea biomasei de alge cultivate pe mediu mixotrof prin electrofloculare și flotare, cu separarea mediului lichid F2 și a biomasei de micro-alge cultivate mixotrof;
- ✓ Omogenizarea la înaltă presiune a biomasei de alge și extragerea lipidelor din omogenizatului de micro-alge, prin folosirea de solvenți organici, urmată de recuperarea prin distilare a solvenților și separarea lipidelor;
- ✓ Trans-esterificarea lipidelor extrase, cu recuperarea glicerinei brute care este utilizată, după aducere la pH neutru cu acid fosforic, ca sursă de carbon pentru suplimentarea adițională a mediului mixotrof de cultivare a algelor, în concentrație adițională de 3 g/l;
- ✓ Hidroliza enzimatică a biomasei delipidizate cu un amestec de hidrolaze, proteaze, amidopeptidaze și  $\beta$ -glucanaze;
- ✓ Separarea prin centrifugare a materialului micro-algal rezistent la hidroliză enzimatică M2, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, și prelucrarea ulterioară a acestui material la bio-cărbune;
- ✓ Concentrarea hidrolizatului de proteine, oligozaharide și fitohormoni prin evaporare în vid, uscarea concentratului de extract enzimatic micro-algal prin pulverizare și granulara pulberii rezultate în pat fluidizat;
- ✓ Purificarea mediului lichid filtrat F2 prin trecere pe bio-cărbunele obținut din material M1 și M2, în raport de 3 g bio-cărbune la 1 litru de mediu, determinarea conținutului de azotat, fosfat și sulfat în mediu lichid recuperat F2, purificat prin

trecere pe biocărbune, și completarea acestora până la nivelul din mediul de cultură lichid inițial, și utilizarea mediului lichid filtrat F2 pentru cultivarea autotrofă a micro-algelor.

Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:

- ✓ Cultivarea autotrofă a micro-algelor pe un mediu mineral până la o densitate de minim 7,5 g/l biomasă, cu cel puțin 20% lipide, inițial pe mediu Zarrouk și apoi pe mediu mineral care include, după primul ciclu, mediu lichid recirculat F2 purificat și completat cu nutrienți minerali la nivelul mediului Zarrouk, într-un fotobioreactor tubular, amplasat parțial sub fotobioreactorul operat mixotrof și parțial umbrit de acesta, menținut în condiții de seră, la  $22\pm 2^\circ\text{C}$  în timpul zilei și  $17\pm 2^\circ\text{C}$  în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, iluminat cu lumina solară, cu intensități care ating  $800 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  în timpul amiezii, suplimentată cu lumină cu intensitatea de  $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scade sub  $500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  și aerat cu 10 litri de amestec gazos cu 5%  $\text{CO}_2$  pe min pe 100 litri de mediu.
- ✓ Recoltarea biomasei de alge, cultivate pe mediu autotrof sau mixotrof, prin electro-floculare și flotare, folosind o celulă electrolică de flotare cu electrozi plăți și perforați, din oțelcarbon OLC 10, cu max. 0,1% C, situați la o distanță de 5 cm unul de altul, aplicându-se tensiunea necesară pentru a avea o intensitate a curentului transmis de 1,33 A, la o energie specifică consumată de  $0,359 \text{ kWhm}^{-3}$ ;
- ✓ Ruperea celulelor de alge unicelulare, cultivate autotrof sau mixotrof, prin trecere pe un omogenizator cu piston prevăzut cu valvă acoperită cu nailon funcționalizat cu polimeri conținând amine terțiare, poli-dimetilaminometilstiren, 3 cicluri la 150 MPa;
- ✓ Extragerea lipidelor din omogenatul de alge unicelulare, cultivate autotrof sau mixotrof, cu hexan, în raport de 1 parte solvent organic la 1 parte omogenat;
- ✓ Hidroliza proteinelor și a acizilor nucleici din biomasa algală cultivată autotrof, delipidizată, cu un amestec de hidrolaze, inițial cu un amestec format din 0,25 părți proteină cu activitate specifică endonucleazică de  $1 \times 10^6$  unități endonuclează / mg proteină, și 0,25 părți proteină cu activitate specifică de 300 unități fosfatază/mg proteină, la 1000 părți biomasă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată, timp de 12 ore la  $45^\circ\text{C}$  și pH 6,5, urmat de tratamentul cu 0,1 părți proteine având activitatea specifică proteazică de 2,4 unități Anson (AU) per gram și 0,1 g părți proteine cu o activitate specifică aminopeptidazică de 500

LAPU/g la 1000 părți biomasă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată, la pH 6,5 și temperatura de 60°C, timp de 16 ore;

✓ Normalizarea hidrolizatului de proteine și acizi nucleici prin ultrafiltrare tangențială pe o membrană cu limita de excludere de 5 kDa, până la 5% azot total și 1,5% fosfor total, și utilizarea acestora ca sursă de azot și fosfor pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor, în concentrație de 12,5 g/l;

✓ Conversia în bio-cărbune și bio-ulei a materialului lignocelulozic micro-algal rezistent la hidroliză enzimatică M1 și, respectiv M2, prin piroliza asistată de micro-unde, la o putere incidentă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub vacuum, care inițial este de 30 mbari, și care crește până la 0,3 bari la punctul maxim de încălzire;

✓ Cultivarea mixotrofă a micro-algelor pe mediu recuperat F1, suplimentat cu glicerină în concentrație inițială de 2 g/l și apoi de 5 g/l, și cu 12,5 g/l hidrolizat de proteine și acizi nucleici, cu 5% N și 1,5% P, până la atingerea unei densități de biomasă de min. 7,5 g/l, cu un conținut de lipide de cel puțin 30%, într-un fotobioreactor tubular, amplasat parțial deasupra fotobioreactorului operat autotrof, menținut în condiții de seră, la 22±2°C în timpul zilei și 17±2°C în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, iluminat cu lumina solară, cu intensități care ating 1000  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  în timpul amiezii, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scade sub 500  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  și aerat cu 20 litri de amestec gazos cu 7,5% CO<sub>2</sub> pe min pe 100 litri de mediu;

✓ Hidroliza proteinelor și a pereților celulari din biomasă algală cultivată mixotrof, delipidizată, cu un amestec de hidrolaze, inițial cu un amestec format din 0,25 părți complex de hidrolaze produs de *Trichoderma viride*, cu 200 unități  $\beta$ -glucan *Botrytis* per g, la pH 5, temperatura de 50°C, la 1000 părți biomasă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată, timp de 12 ore la 50°C și pH 5, urmat de tratamentul cu 0,1 părți proteine având activitatea specifică proteazică de 2,4 unități Anson (AU) per gram și 0,1 g părți proteine cu o activitate specifică aminopeptidazică de 500 LAPU/g la 1000 părți biomasă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată, la pH 6,5 și temperatura de 60°C, timp de 16 ore;

✓ Concentrarea hidrolizatului de proteine, oligozaharide și fitohormoni prin evaporare în vid până la 10% substanță uscată determinată refractometric, uscarea concentratului de extract enzimatic micro-algal prin pulverizare, la o



temperatură de intrare de 150...165°C și la o temperatură de ieșire de 75..80°C, și granularea pulberii rezultate în pat fluidizat, format prin injectarea de aer la o presiune de 2,5 bari și cu un debit de 65 ...85 m<sup>3</sup>/h, și operat la o temperatură de 55°C în timpul umectării prin stropire cu soluție de alcool etilic 15% pentru aglomerare și de 75°C în timpul uscării granulelor poroase formate.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Asigură recircularea a peste 90% din apa utilizată pentru cultivarea micro-algelor, și reduce cu peste 50% consumul de nutrienți minerali;
- Elimină compușii organici care pot avea efecte dăunătoare asupra productivității culturii de microalge, inclusiv TEPs care favorizează formarea de fotobiofilme, din mediul lichid recirculat, în cursul etapelor de separare prin electrofloculare și flotație și de purificare prin trecere pe coloană de biocărbune.
- Permite acumularea superioară de biomasă de alge unicelulare și de lipide în biomasa de alge, datorită suplimentării mediului mixotrof de cultivare cu surse organice de carbon, azot și fosfor;
- Stimulează creșterea mixotrofă a algelor datorită acumulării de fitohormoni algali și de aminoacizi precursori ai fitohormonilor algali în hidrolizatele enzimatiche de biomasă algală delipidizată utilizate pentru suplimentarea mediului mixotrof;
- Favorizează adaptarea algelor cultivate mixotrof la condiții de mediu adverse, reprezentate de intensități mai ridicate ale iluminării și de concentrații ridicate de CO<sub>2</sub> în gazele de aerare a mediului de cultură, datorită acumulării de compuși osmoprotectanți, în special prolină, în hidrolizatele enzimatiche de biomasă algală delipidizată;
- Valorifică potențialul de compuși utili pentru plantele de cultură din biomasa de micro-alge, fitohormoni, compuși osmoprotectanți, activatori ai rezistenței sistemice / elicitori, prin hidroliză enzimatică specifică, care eliberează fitohormoni din conjugatele lor, prolina osmoprotectantă și aminoacizii precursori de fitohormoni din proteinele micro-algale, elicitorii β-oligozaharidici din pereții celulari;
- Utilizează prin reciclare în cadrul procedului de cultivare mixotrof glicerina brută, produs secundar de la procesarea lipidelor din biomasa algală în biocombustibili.

În continuare invenția va fi descrisă în detaliu cu referire și la figura 1 care prezintă schema procedului de cultivare descris.

Fig.1 Schema procedurii de cultivare continuă a micro-algelor, într-un sistem de două fotobioreactoare operate în cascadă, în ciclul autotrof – mixotrof, prin care se asigură recircularea apei și a unei părți din nutrienți, și prin care se obțin biocombustibili din lipidele algale, extract algal cu acțiune complexă asupra plantelor de cultură și bio-cărbune ameliorator de sol.

*Exemplul.* Într-un fotobioreactor tubular (Phyta Platform, Culturing Solution, Tampa, FL, SUA), amplasat parțial sub fotobioreactorul operat mixotrof și parțial umbrit de acesta, se introduc 120 litri de mediu lichid Zarrouk, a cărui compoziție este prezentată în tabelul 1 de mai jos.

Tab. 1. Compoziția mediului nutritiv Zarrouk

Compoziții mediu	Zarrouk
NaHCO <sub>3</sub>	16,80 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50 g/l
NaNO <sub>3</sub>	1,875 g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00 g/l
NaCl	1,00 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,20 g/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,04 g/l
Soluție de microelemente*	1 ml
Soluție de Fe chelatat**	5 ml

\*Micronutrienți soluție stoc (g/l): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,860; MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 2,030; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,222; MoO<sub>3</sub> (85%) 0,018; Cu SO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0,079; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0,494.

\*\* Pentru prepararea soluției stoc de Fe chelatat s-au dizolvat în 80 ml de apă distilată 0,69 g de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O și 0,93g Na<sub>2</sub>EDTA. După fierbere pentru o scurtă durată de timp și răcire la temperatura camerei se aduce soluția finală la un volum de 100 ml.

Se cultivă autotrof micro-alge, de ex. tulpina 424-1 de *Nannochloris* sp., depozitată sub numărul CCAP 251/10 la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), SAM Research Services Ltd., Scottish Marine Institute, Aryll, UK., timp de circa 72 ore, până la atingerea unei densități de biomasă de min. 7,5 g/l, cu un conținut de lipide de cel puțin 20%. Fotobioreactorul este menținut în condiții de seră, la 22±2°C în timpul zilei și 17±2°C în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, iluminat cu lumina solară, în condiții de seră, la 22±2°C în timpul zilei și 17±2°C în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, iluminat cu lumina solară, cu intensități care ating 800 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> în timpul amiezii, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, provenită din lămpi cu halogen, atunci când

intensitatea luminoasă scade sub  $500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , și aerat cu 10 litri de amestec gazos cu 5%  $\text{CO}_2$  pe min pe 100 litri de mediu.

Se recoltează biomasa algală prin electro-floculare și flotare, folosind o celulă electrolică de flotare cu electrozi plăți și perforați. Celula electrolică are un volum de 12 litri, cu dimensiuni de  $7,5 \times 40 \times 40$  cm, fiind confecționată din polimetacrilat, cu un preaplin pentru separarea biomasei flotante. Electrozii sunt din plăci perforate de  $42 \times 39$  cm din oțel carbon OLC 10, cu max. 0,1% C, de grosime 0,5 cm. Perforațiile au un diametru de 0,3 cm fiind amplasate la 0,25 cm unele de altele. Electrozii sunt situați la o distanță de 5 cm unul de altul, la 1 cm de pereții verticali laterali ai celulei de electrofloculare și flotare, la 0,5 cm de fundul celulei de electrofloculare și flotare, la 1 cm de peretele vertical frontal al celulei, situat în zona preaplinului, și fixați de peretele frontal opus. Electrozii sunt conectați la o sursă de curent continuu (Mastech HY1803DL, Acifica, San Jose, CA, SUA), timp de 60 secunde, aplicându-se tensiunea necesară pentru a avea o intensitate a curentului transmis de 1,33 A, la o energie specifică consumată de  $0,359 \text{ kWhm}^{-3}$ .

Datorită polarizării în curent continuu a electrozilor are loc o reacție de electroliză. La anod se formează ioni feroși și/sau ferici,  $\text{Fe} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^-$  sau  $\text{Fe} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + 3\text{e}^-$ . În paralel pe anodul de fier / oțel carbon, are loc și o reacție de oxidare a apei cu formare de oxigen:  $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ . Pe catod are loc reacția de reducere a apei, cu formare de hidrogen,  $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$ . Ionii ferici/ feroși formează diferite specii ionice,  $\text{FeOH}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2^{2+}$ ,  $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ ,  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_8(\text{OH})_2^{4+}$ ,  $\text{Fe}_2(\text{H}_2\text{O})_6(\text{OH})_4^{2+}$ , care interacționează cu celulele algale, încărcate negativ, și cu particulele de exopolimer transparente (care sunt polizaharide polianionice, carboxilate și sulfatate – Discart *et al.* 2014, *Bioresource Technology* 152:321–328), coagulându-le. Gazele formate antrenează coaguli în flocoane care au o densitate mai mică decât a apei și care flotează în canalul delimitat de electrozi, deplasându-se spre zona de preaplin și separând biomasa algală de mediul de cultură prin fereastra de preaplin și conducta aferentă, într-un vas de colectare. În vasul de colectare se obține un concentrat de alge, care se prelucrează în continuare, iar în celula de electroliză rămâne mediul mineral recirculat F1, care se utilizează ca bază pentru cultura mixotrofă.

Hidrogenul în stare născândă reduce peroxizii lipidici din mediul de cultură, limitând efectul lor negativ asupra dezvoltării ulterioare a micro-algelor. Datorită acțiunii combinate a gazelor și a speciilor de fier încărcate pozitiv precipitante are loc o precipitare și o reducere a conținutului de compuși organici (poli)anionici care pot avea efecte dăunătoare asupra productivității culturii de microalge.

În mediul de cultură autotrof și în mediul lichid F1, recuperat după electrofloculare și flotație, s-au determinat conținuturile de TEPs (utilizând metoda spectrofotometrică descrisă de Arruda *et al.*, 2004, *Talanta*, 62: 81–85) și de peroxizi lipidici (Hodges *et al.* 1999, *Planta* 207: 604–611).

Conținutul de TEPs se reduce de la 6,4 mg/l în mediul de cultură inițial la 1,2 mg/l, după procesul de electrofloculare, valorile de sub 1,5 mg/l reducând semnificativ riscul formării fotobiofilmelor (Discart *et al.* 2014, *Bioresource Technology* 152:321–328). Nivelul de peroxizi lipidici, estimați ca malondialdehidă, se reduce de la 4,2  $\mu\text{moli/ml}$  în mediul de cultură inițial la 1,4  $\mu\text{moli/ml}$ , după procesul de electrofloculare, valorile de sub 2,5  $\mu\text{moli/ml}$  fiind tolerate de micro-alge (Bosma *et al.*, 2008, *Biotechnology and Bioengineering*, 101: 1108–1114)

Concentratul de biomasă algală se omogenizează într-un omogenizator cu piston, GEA Niro Soavi Arriete NS2006 (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) prevăzut cu o valvă acoperită cu nailon funcționalizat cu polimeri conținând amine terțiare, poli-dimetilaminometilstiren, 3 cicluri la 150 MPa, trei cicluri la 150 MPa, câte 0,3 litri/min.

Valva din oțel inoxidabil SS314 este degresată, pasivată cu o soluție de acid citric, și apoi acoperită cu pulbere de nailon (poliamidă) VESTOSINT® 1111 Gray Nylon (Evonik Industries, Essen, Germania), într-un strat de 500 $\mu\text{m}$ , aplicat în pat fluidizat la 220°C. Stratul de nailon / poliamidă se funcționalizează cu polimeri conținând amine terțiare, poli-dimetilaminometilstiren (pDMAMS). pDMAMS se depune pe stratul de nailon al valvei folosind un reactor continuu de depunere a filmelor de polimeri (Denton Vacuum, Moorestown, NJ, SUA). Pentru polimerizare, monomerul, N-4-vinilbenzil-N,N-dimetilamină (DMAMS, 90%, Acros Organic, Geel, Belgia) și inițiatorul, terț-butil peroxid (TBPO, 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA), sunt utilizate fără purificare. DMAMS se încălzește la 50°C și se introduce în reactorul de depunere la un debit de 1,2 Ncm<sup>3</sup>/min. TBPO este suficient de volatil pentru a intra în reactor la un debit de 0.6 Ncm<sup>3</sup>/min fără încălzire. Reactorul se menține la un vacuum parțial de 200 mTorr, iar valva este

menținută la 30°C. Temperatura filamentului reactorului se menține la 200°C, fiind inițiată formarea unui film de pDMAMS pe stratul de nailon/poliamidă care acoperă valva omogenizatorului.

Omogenizarea la înaltă presiune prin valva acoperită cu nailon funcționalizat determină ruperea pereților prin liză indusă de variațiile de presiune și desfacerea membranelor datorită perturbărilor induse stratului bilipidic. Stratul bilipidic din celulele de alge este atras prin interacție electrostatică de filmul de polimer cu amine terțiare. Perturbarea echilibrului electrostatic local determină o rearanjare a structurii stratului bilipidic, cu slăbirea legăturilor intermoleculare responsabile de interacția hidrofobă care stabilizează stratul bilipidic (rețeaua de legături de hidrogen a moleculelor de apă care înconjoară stratul bilipidic, forțele London dintre resturile hidrocarbonate de acizi grași).

Din omogenizatul algal rezultat se extrag lipidele cu n-hexan, în raport de 1 parte solvent organic la 1 parte omogenat la 1 parte omogenat. Lipidele se trans-esterifică prin folosirea unui catalizator bazic, alcoxid de potasiu. 100 părți de ulei algal, reacționează în autoclavă, sub atmosferă protectoare de azot, și la 40°C, timp de 8 ore, cu o soluție obținută din 0,8 g hidroxid de sodiu 99,1% și 11,3 g metanol 99,9%, cu recuperarea glicerolului brut care este adus la pH neutru prin neutralizare cu acid fosforic, și utilizarea acestuia ca sursă de carbon pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor.

Trans-esterificarea se poate realiza prin orice alt procedeu cunoscut, cu recuperarea glicerolului brut care este adus la pH neutru prin neutralizare cu acid fosforic și/sau hidroxid de potasiu, și utilizarea acestuia ca sursă de carbon pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor

Acizii nucleici și proteinele din biomasa algală delipidizată se hidrolizează cu un amestec de hidrolaze. Inițial se tratează 1000 părți biomasa algală delipidizată, care are o umiditate reziduală de peste 80%, cu un amestec format din 0,25 părți proteină cu activitate specifică endonucleazică de  $1 \times 10^6$  unități endonuclează / mg proteină (cca 0,28 părți de Benzonase, purity grade II >90%, Merck Millipore, Darmstad, Germania, amestec de endonucleaze din *Serratia marcescens*, obținut prin exprimarea genelor specifice în *E. coli*) și 0,25 părți proteină cu activitate specifică de 300 unități fosfatază/mg proteină (cca 0,5 părți din fosfataza alcalină purificată din cultură de *Bacillus licheniformis* MTCC 1483, conform procedurii descris de Pandey și Banik, 2011, Biores. Technol., 102:

4226-4231), timp de 12 ore la 45°C și pH 6,5. O unitate de Benzonase este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care determină, în condiții standard, o creștere a absorbantei A260 cu 1.0 în 30 min, corespunzând la o digestie completă de 37 μg ADN. Condițiile standard de reacție sunt 1 mg/ml substrat sonicat ADN, respectiv spermă de somon, în tampon 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,1 mg/ml BSA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, incubare la 37°C. O unitate de fosfatază alcalină este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care determină, în condiții standard, eliberarea a 1 μmoli p-nitrofenol per min. Condițiile standard sunt: 0,1 ml probă enzimatică adăugat peste 1.9 ml soluție p-nitro-fenil fosfat, sare disodică (2 mg per ml în tampon 1 M Tris-HCl, pH 10.0) și incubarea amestecului la 50°C. Orice tip de combinație de endonucleaze și fosfatază alcalină poate fi folosită, cu condiția de a asigura o activitate enzimatică similară în amestec,

După hidroliză enzimatică a acizilor nucleici, cu amestec de endonucleaze și fosfatază alcalină, se hidrolizează proteinele din biomasa algală delipidizată. Se tratează 1000 părți algală delipidizată, care are o umiditate reziduală de peste 80%, cu un amestec format din 0,1 părți proteine având activitatea specifică proteazică de 2,4 unități Anson (AU) per gram (0,1 părți Alcalase AF 2.4 L, Novozyme, Novozyme A/S, Bagvaerd, Danemarca, endopeptidază bacteriană din *Bacillus licheniformis*, cu subtilizină/serin endo-peptidază ca principal component enzimatic, având activitatea specifică de 2,4 unități Anson (AU) per gram) și 0,5 g părți proteine cu o activitate specifică aminopeptidazică de 500 LAPU/g (Flavourzyme 500 MG, Novozyme, un complex de amidopeptidaze / exopeptidaze și endo-proteaze, obținut din *Aspergillus oryzae*, cu o activitate de 500 LAPU/g), la pH 6,5 și temperatura de 60°C, timp de 16 ore. O unitate Anson este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, la pH 7.5, 25°C și 10 min timp de reacție, digeră hemoglobina denaturată cu o viteză inițială care produce într-un minut o cantitate de compuși solubili în acid tricloracetic care dau aceeași culoare cu reactivul Folin-Ciocalteu ca și 1 miliechivalent de tirozină. O unitate LAPU, unitate leucină aminopeptidazică, este cantitatea de enzimă care hidrolizează 1 μmol de leucin-p-nitroanilid/min, în condiții standard, 26 mM of L-leucin- p-nitroanilid ca substrat, tampon 0,1 M Tris - HCl, pH 8.0, 40°C). Orice tip de combinație de endoproteaze și amidopeptidaze/exo-proteaze poate fi folosită, cu condiția de a asigura o activitate enzimatică similară în amestec.

Materialul algal M1 rezistent la hidroliză enzimatică, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, se separă prin centrifugare, prin centrifugare continuă pe o centrifugă continuă de laborator Westfalia Laboratory Separator, model SA 1-02-175 (GEA Westfalia Separator Group, Oelde, Germania), care este operată la o viteză a discurilor de centrifugare de 10.000 rpm, echivalent a  $8000 \times g$ ; la o rată de alimentare de 1 litru/min, cu separarea continuă a hidrolizatului enzimatic clarificat și discontinuă a concentratului de pereți celulari, ajuns la o densitate de  $1100 \text{ kg/m}^3$ .

Supernatantul se reia și este ultrafiltrat tangențial pe un sistem de ultrafiltrare tangențială Prostack (Merck Millipore, Billerica, MA, SUA) prevăzut cu o membrană Ultracel PLAC (Merck Millipore) din celuloză regenerată, cu limită de excludere de 5 KDa. Concentrarea proteinelor hidrolizate, aminoacizi și/sau peptide în permeat este continuată până la atingerea unei concentrații de 5% azot total și 1,5% fosfor total în permeat, controlată prin dozarea azotului total și a fosforului. Din permeat se prelevează probe în care se analizează periodic pentru conținutul azot total folosind metoda Kjeldahl (EN 13342-2001) și după extragere în apă regală (EN 13346-2000).

Materialul algal (ligno)celulozic recalcitrant M1 se convertește în biocărbune și bio-ulei, prin piroliză asistată de microunde. Tratamentul cu microunde se realizează folosind un reactor cu microunde (Minilabotron 2000, Sairem), cu un modul de vacuum amplasat în serie (VA 2000, Milestone, Sorisole, Italia), după o trapă de vacuum răcită cu apă pentru colectarea și condensarea vaporilor produși în timpul pirolizei. 500 grame de material lignocelulozic recalcitrant se introduc într-un reactor de sticlă pirex de 3 litri. Se expune materialul vegetal la o putere incidentă constantă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub vacuum, care inițial este de 30 mbari, și care crește până la 0,3 bari la punctul maxim de încălzire. Se obține o cantitate de 182,4 g de biocărbune, corespunzând unei conversii de 35,9% în bio-cărbune și de 128,5 grame bio-ulei, corespunzând unei conversii de 26,8% a materialului vegetal inițial în bio-ulei.

Cultivarea algelor unicelulare se realizează în continuare pe mediu mixotrof, rezultat din mediu lichid F1 recuperat din etapa de electrofloculare, suplimentat cu glicerină brută și hidrolizate de proteină și acizi nucleici micro-algali. Glicerina brută în primul ciclu este adăugată în cantitate de 2 g/l. În următoarele cicluri de cultivare, în care se introduce și glicerina recuperată din biomasa cultivată

mixotrof, suplimentarea este cu 5 g/l. Mediul mixotrof se suplimentează și cu 12,5 g/l hidrolizat de proteine și acizi nucleici, cu 5% N și 1,5% P. Într-un fotobioreactor tubular (Phyta Platform, Culturing Solution, Tampa, FL, SUA), amplasat parțial deasupra fotobioreactorului operat autotrof, se aduc 120 litri de mediu mixotrof. Fotobioreactorul este menținut în condiții de seră, la  $22\pm 2^\circ\text{C}$  în timpul zilei și  $17\pm 2^\circ\text{C}$  în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, iluminat cu lumina solară, cu intensități care ating  $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  în timpul amiezii, suplimentată cu lumină cu intensitatea de  $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scade sub  $500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  și aerat cu 20 litri de amestec gazos cu 7,5%  $\text{CO}_2$  pe min pe 100 litri de mediu;

Se cultivă mixotrof diferite tulpini de micro-alge, inclusiv tulpina 424-1 / CCAP 251/10 de *Nannochloris* sp., care a fost cultivată anterior autotrof. Tulpinile cultivate mixotrof au o capacitate mai ridicată de a rezista la stresurile induse de o iluminare mai intensă, și de o aerarea cu gaze de ardere cu un conținut mai ridicat de bioxid de carbon datorită prezenței diferiților osmoprotectanți, inclusiv a prolinei care reduce efectul nociv al speciilor reactive de oxigen (Siripornadulsil *et al.*, 2002, Plant Cell, 14: 2837–2847). Microalgele se cultivă timp de circa 72..80 ore, până la atingerea unei densități de biomasă de min. 7,5 g/l, cu un conținut de lipide de cel puțin 30%. Acumularea suplimentară de lipide se datorează suplimentării mediului de cultură cu sursă de carbon fixat, respectiv glicerină brută

Se recoltează biomasa prin electrofloculare și flotație, aplicându-se același procedeu ca în cazul culturii autotrofe, descris mai sus. Se procedează similar la omogenizarea la înaltă presiune a biomasei de alge și la extragerea lipidelor din omogenizatul de micro-alge, prin folosire de n-hexan, urmată de recuperarea prin distilare a solvenților și separarea lipidelor. Se trans-esterifică lipidelor extrase, cu recuperarea glicerinei brute care este utilizată, după aducere la pH neutru cu acid fosforic, ca sursă de carbon pentru suplimentarea adițională a mediului mixotrof de cultivare a algelor, în concentrație adițională de 3 g/l.

Hidroliza enzimatică a biomasei delipidizate se realizează cu un amestec de hidrolaze, proteaze, amidopeptidaze și  $\beta$ -glucanaze. Inițial se utilizează un amestec format din 0,25 părți complex de hidrolaze produs de *Trichoderma viride*, cu 200 unități  $\beta$ -glucan *Botrytis* per g, la pH 5, temperatura de  $50^\circ\text{C}$ , la 1000 părți biomasă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată. Se menține timp de 12 ore la  $50^\circ\text{C}$  și pH 5.



Complexul de hidrolaze folosit este Glucanex 200 G (Novozyme A/S), un amestec de enzime litice din *Trichoderma harzianum*, care include celuloze,  $\beta$  1-3 și  $\beta$  1-6 glucanaze, proteaze și chitinaze. O unitate  $\beta$ -glucan *Botrytis* este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, la 30,0°C, pH 4,4, timp de 10 min, eliberează 1 mmol de grupări reducătoare carbohidrați (calculate ca glucoză) per min.

După hidroliză enzimatică parțială a polizaharidelor și a proteinelor din peretele celular, cu amestec de complex de hidrolaze produs de *Trichoderma viride*, se finalizează hidroliza proteinelor din biomasa algală delipidizată. Se tratează 1000 părți algală delipidizată și tratată anterior cu enzime litice din *T. viride*, care are o umiditate reziduală de peste 80%, cu un amestec format din 0,1 părți proteine având activitatea specifică proteazică de 2,4 unități Anson (AU) per gram (0,1 părți Alcalase AF 2.4 L, Novozyme) și 0,5 g părți proteine cu o activitate specifică aminopeptidazică de 500 LAPU/g (Flavourzyme 500 MG, Novozyme), la pH 6,5 și temperatura de 60°C, timp de 16 ore.

Hidrolizatul de proteine, oligozaharide și fitohormoni se concentrează prin evaporare în vid, până la 10% substanță uscată determinată refractometric, prin folosirea unui evaporator sub vid Simax de 5 l/h (Kavalier, Sazava, Cehia). Concentratul de extract enzimatic micro-algal se usucă prin pulverizare, folosind un uscător prin pulverizare de mici dimensiuni (Niro Minor Unit<sup>TM</sup>, GEA Process Engineering A/S, Søborg, Danemarca), la o temperatură de intrare de 150...165°C și la o temperatură de ieșire de 75...80°C. Pulberea rezultată se granulează în pat fluidizat, format într-un granulator în pat fluidizat Mini-Glatt (Glatt Ingenieurtechnik GmbH, Weimar, Germania) prin injectarea de aer la o presiune de 2,5 bari și cu un debit de 65 ...85 m<sup>3</sup>/h. Granulatorul este operat la o temperatură de 55°C în timpul umectării prin stropire cu soluție de alcool etilic 15% pentru aglomerare și de 75°C în timpul uscării granulelor poroase formate.

Extracția hidrolitică a biomasei algale delipidizate cu un amestec de hidrolaze produs de *Trichoderma* determină formarea din materialul vegetal a unui amestec de compuși de hidroliză, în special  $\beta$ -oligozaharide, care prezintă un tipar molecular similar celui asociat distrugerilor (de perete celular). Un astfel de tipar molecular determină la plante activarea răspunsului de apărare din plante – a se vedea, de ex, review-ul Hermosa *et al.*, 2013, Int. Microb., 16:69-80.

Activarea răspunsului de apărare din plante de către oligozaharidele formate în extractul enzimatic din micro-alge delipidizate a fost verificată prin determinarea alcalinizării mediului de cultură a unei suspensii de celule de tutun pe mediu Murashige și Skoog cu pH inițial 5.8 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Olanda), suplimentat cu  $0,2 \text{ g l}^{-1}$  2,4-D,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  tiamină,  $100 \text{ mg l}^{-1}$  mio-inozitol,  $200 \text{ mg l}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , și  $30 \text{ g l}^{-1}$  de zaharoză, conform metodei descrise de Klarzynski *et al.* 2000, *Plant Physiol*, 124: 1027-1038. S-a lucrat comparativ cu un produs standard reprezentat de laminarină din *Laminaria digitala* (Sigma Aldrich). O doză de  $250 \text{ }\mu\text{g/ml}$  extract enzimatic de microalge, realizat conform procedurii de mai sus, a determinat o alcalinizare de 1.8 unități pH, similară cu cea produsă de  $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$  laminarină. Laminarina este omologată ca biofungicid pentru combaterea bolilor foliare la legume și pomi fructiferi, prin activarea sistemică a rezistenței plantelor de cultură, deci și compușii rezultați prin extracția enzimatică a biomasei de micro-alge delipidizate cultivate mixotrof, care conțin  $\beta$ -oligozaharide, obținuți prin procedeul descris mai sus, și care au o activitate biologică similară, de elictori ai răspunsului de apărare / rezistenței sistemice la plante pot fi utilizați ca biofungicide, pentru protecția plantelor de cultură, în special a legumelor și a pomilor fructiferi.

Hidrolizatul de proteine, oligozaharide și fitohormoni uscat și granulat a fost testat și în condiții de seră, pe plante de tomate, pentru a verifica acțiunea osmoprotectantă a prolinei din hidrolizatele proteice și a glicinbetainei. Plantele de tomate (*Lycopersicum esculentum* cv. Cristal F1), răsaduri de 60 zile, au fost transplantate în vase de vegetație de 25 cm și 50 cm înălțime, în care s-au introdus câte 5 litri de substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți pentru primele săptămâni de creștere (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV, Oosterhout, Olanda). Vasele de vegetație au fost menținute în condiții de seră, la  $22\pm 2^\circ\text{C}$  în timpul zilei și  $17\pm 2^\circ\text{C}$  în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de  $160 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$ , provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub  $500 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$ . Experimentul a durat 56 zile. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai o singură dată, după 28 zile de la transplantare, prin aplicarea a 100 ml de soluție nutritivă  $1 \text{ g/l}$  de îngrășământ 20-8-20 ( $\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$ , Eurofertil, TimacAgro Romania). Experimentul a fost organizat în bloc randomizat cu câte 4 repetiții pentru fiecare variantă, fiecare

repetiție incluzând câte 5 plante. Variantele testate experimental au inclus și martori stropiți cu apă, stresat hidric și nestresat, și un produs de referință, Maxicrop Original (MaxiCrop, Corby, Marea Britanie), care conține 8% substanță uscată extrasă din *Ascophyllum nodosum*. Aceste variante experimentale au fost:

V<sub>1</sub> – martor nestresat hidric, tratat cu apă; 2 tratamente x 2 ml per plantă echivalent 100 l/ha;

V<sub>2</sub> – martor stresat hidric, tratat cu apă, 2 tratamente x 2 ml per plantă echivalent 100 l/ha;

V<sub>3</sub> – nestresat hidric, tratat cu Maxicrop Original, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,48% per plantă, echivalent 6 litri cu 8% s.u. în 100 l/ha

V<sub>4</sub> – stresat hidric, tratat cu Maxicrop Original, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,48% per plantă, echivalent 6 litri cu 8% s.u. în 100 l/ha;

V<sub>5</sub> – nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,5% per plantă, echivalent 0,5 kg în 100 l/ha

V<sub>6</sub> – stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,5% per plantă, echivalent 0,5 kg în 100 l/ha;

Tratamentele s-au aplicat în a 2-a și a 29-a zi după transplantare, prin stropirea fiecărei plante cu ajutorul un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Healthcare, Somerset, PA, SUA). Martorul nestresat hidric a fost udat o dată la cinci zile la 100% capacitate de câmp, iar variantele stesate hidric au fost udate la două săptămâni la 100% capacitate de câmp. La sfârșitul celor 8 săptămâni de la transplantare s-a desființat experiența, determinându-se parametri morfologici ai plantelor, respectiv înălțimea plantelor, lungimea rădăcinii, numărul de frunze și suprafața frunzelor, ca și masa de fructe coapte per plantă. În recolta de roșii s-a determinat seleniul, prin spectrofotometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri (Tinggi *et al.*, 1992, J. Food Comp. Anal. 5, 269-280). Datele s-au prelucrat prin analiza variantei (ARM 8, Gylling Data Management, Brookings, SD, SUA).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos. Hidrolizatul de proteine, oligozaharide și fitohormoni, obținută conform procedului descris de această invenție, stimulează creșterea plantelor și ameliorează rezistența plantelor de tomate la stresul hidric. Acțiunea compoziției realizate este similară cu cea a produsului de referință utilizat, un extract de macro-alge, care conține 8% substanță uscată extrasă din *Ascophyllum nodosum*. Ingredientele active care

acționează asupra plantelor de tomate, determinând creșterea rezistenței al stresul hidric și stimulând creșterea și dezvoltarea sunt fitohormonii (în special citochinină), aminoacizii precursori de fitohormoni, prolina și betaina cu acțiune osmoprotectantă.

Tab. 1. Influența tratamentelor cu compoziții realizate conform invenției asupra plantelor de tomate, stresate și nestresate hidric\*.

VARIANTĂ EXPERIMENTALĂ	ÎNĂLȚIME PLANTE (cm)	LUNGIME RĂDĂCINI (cm)	NUMĂR FRUNZE	SUPRAFAȚĂ FRUNZE (mm <sup>2</sup> )	PRODUCȚIE MEDIE** (g fructe coapte / plantă)
V <sub>1</sub> martor nestresat hidric, tratat cu apă	56.15±1.74b	54.42±0.84b	32.00±5.2b	669.47±6.12b	315±42,4b
V <sub>2</sub> martor stresat hidric, tratat cu apă	42.02±3.64c	34.75±3.12c	22.50±2.2c	527.50±2.92c	182±32,6c
V <sub>3</sub> nestresat hidric, Maxicrop Original, 2x 0,48% echiv. 6 litri 8% s.u. în 100 l/ha	62.30±3.42a	53.50±2.39b	33.00±2.1b	675.58±2.92ab	373±28,2a
V <sub>4</sub> stresat hidric, Maxicrop Original, 2x 0,48% echiv. 6 litri cu 8% s.u. în 100 l/ha	52.50±2,89b	53.20±1.93b	32.20±3.8b	663.16±5.84ab	302±38,6b
V <sub>5</sub> nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2x 0,5% echiv. 0,5 kg în 100 l/ha	63.25±1.49a	57.25±1.22a	43.50±4.4a	709.21±4.59a	364±22,4a
V <sub>6</sub> stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2 x 0,5% echiv. 0,5 kg în 100 l/ha;	52.50±4.64b	52.20±1.82b	33.01±2.6b	662.16±8.24b	319±35,6b

\*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05; \*\*Producția pe 30 zile ciclu de înflorire - fructificare

Materialul recalcitrant M2 rezistent la hidroliză se convertește în biocărbune și bio-ulei. 500 grame de material lignocelulozic recalcitrant M2 se introduc într-un reactor de sticlă pirex de 3 litri. Se expune materialul vegetal la o putere incidentă constantă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub vacuum, care inițial este de 30 mbari, și care crește până la 0,3 bari la punctul maxim de încălzire. Se obține o cantitate de 173,6 g de biocărbune, corespunzând unei conversii de 34,2% în bio-cărbune și de 132,3 grame bio-ulei, corespunzând unei conversii de 27,6% a materialului vegetal inițial în bio-ulei.

Biocărbunele rezultat din material M1 și M2 se reunește și se trece într-o coloană. Se utilizează, în raport de 3 g biocărbune la 1 litru de mediu, pentru purificarea suplimentară a mediului lichid recuperat F2. Cele 366 de grame de biocărbune format din materialul algal recalcitrant la hidroliza algală sunt utilizabile pentru a purifica peste 120 litri de mediu lichid recuperat F2.

În mediul de cultură mixotrof și în mediul lichid F2 purificat (recuperat după electrofloculare și flotație și trecut pe coloană de biocărbune), s-au determinat conținuturile de TEPs (utilizând metoda spectrofotometrică descrisă de Arruda *et*

*al.*, 2004, *Talanta*, 62: 81–85) și de peroxizi lipidici (Hodges *et al.* 1999, *Planta* 207: 604–611).

Conținutul de TEPs se reduce de la 7,4 mg/l în mediul de cultură inițial mixotrof la 0,2 mg/l, după procesul de electrofloculare și de purificare pe bio-cărbune. Așa cum s-a arătat valorile de sub 1,5 mg/l reduc semnificativ riscul formării fotobiofilmelor (Discart *et al.* 2014, *Bioresource Technology* 152:321–328). Nivelul de peroxizi lipidici, estimat ca malondialdehidă, se reduce de la 4,6 μmoli/ml în mediul de cultură inițial la 0,4 μmoli/ml, după procesul de electrofloculare și de purificare pe bio-cărbune, cu mult sub valorile care pot determina fenomene inhibitorii în culturile de micro-alge (Bosma *et al.*, 2008, *Biotechnology and Bioengineering*, 101: 1108–1114).

Biocărbunele utilizat pentru purificarea mediului lichid de cultură a fost recuperat, fiind utilizabil ca ameliorator de sol. Bio-cărbunele recuperat a fost analizat conform EBC (2012), „European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar.”, European Biochar Foundation (EBC), Arbaz, Switzerland. Probele au fost analizate din punct al vedere al conținutului de apă, conform DIN 51718, cu un aparat HR 73 Halogen Moisture Analyzer (Metler Toledo, Columbus, OH, SUA), conținutul de cenușă după carbonizare la 550°C, prin analogie cu prevederile standardului de analiză DIN 51719/EN 14775, conținutul de carbon, hidrogen, azot, sulf și oxigen (calculat), conform metodelor standard de analiză DIN 51732, DIN 51732, DIN 51724-3, respectiv DIN 51733 prin folosirea unui aparat de analiză elementală 2400 series II CHNS/O Analyzer (Perkin Elmer, Waltham, MA, SUA), elementele potențial toxice și microelementele, respectiv Pb, Cd, Cu, Ni, Hg, Zn, Cr, B, Mn după digestie cu microunde conform EN ISO 17294-2 /EN 1483, utilizând un digestor cu microunde Speed Vave (Bergoff, Eningen, Germania) și un spectrometru ICP-OES Optima 2100 (Perkin Elmer), elementele principale, P, Mg, Ca, K, Na, Fe, S conform EN ISO 11885 /EN ISO 17294-2, hidrocarburile policiclice aromatice conform EN 15527, după extracție cu toluen, prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă, folosind sistem Agilent 7890 A/B GC 7000 C triplu quad MS/MS Bundle 11-134 (Agilent Technologies), valoarea pH conform metodei standard DIN ISO 10390 (CaCl<sub>2</sub>), folosind un aparat multiparametric C932 T (Consort, Turnhout, Belgia), suprafața specifică conform metodei BET (Brunauer,

Emmett and Teller) conform ISO 9277 folosind un analizor Gemini 2375 (Micromeritics, Norcross, GA, SUA).

Rezultatele obținute sunt prezentate în tab. 2, comparativ cu valorile stabilite de European Biochar Foundation (EBC) pentru bio-cărbunele din categoria premium. Aceste rezultate demonstrează că bio-cărbunele obținut prin aplicarea procedurii conform invenției, prin piroliza asistată de microunde a materialului recalcitrant din alge, se încadrează în categoria premium EBC.

Biocărbunele astfel obținut reprezintă un ameliorator de sol. Biocărbunele aplicat ca ameliorator de sol reprezintă o formă durabilă de stocare a carbonului în sol, care determină o serie de efecte benefice din punct de vedere al mediului (de ex. reducerea spălării și levigării produselor agrochimice din sol) și al producțiilor agricole (Xu *et al.*, 2012. CLEAN–Soil, Air, Water, 40(10), 1093-1098).

Tab. 3. Parametrii de calitate ai bio-cărbunelui obținut prin aplicarea procedurii conform invenției, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant provenit din *E. arvense*.

Caracteristică calitate	Limite Euro-Charpremium	Bio-cărbune conform procedeu
Umiditate	<5%	4,57%
Carbon total	>50%	57,4%
Carbon organic	10-40%	35,5%
Raport molar H/C	<0,6	0,47
Raport molar H/O	<0,4	0,34
Elemente nutritive	1-40%	5,53%
P		2,16%
Mg		0,46%
Ca		0,89%
K		1,53%
Fe		0,03%
S		0,48%
Metale grele / microelemente		
Pb	Pb < 120 g/t SU;	12,3±1,9
Cd	Cd < 1 g/t SU;	0,41±0,08
Cu	Cu < 100 g/t SU;	10,6±1,5
Ni	Ni < 30 g/t SU;	6,0±0,8
Hg	Hg < 1 g/t SU;	0,05±0,01
Zn	Zn < 400 g/t SU;	273,2±16,3
Cr	Cr < 80 g/t SU	36,7±4,12
Suprafață specifică	>150 m <sup>2</sup> /g	294 m <sup>2</sup> /g
pH	<10	8,3

In mediul lichid recuperat F2 și purificat prin trecere pe bio-cărbunele obținut din material M1 și M2 se determină conținutul de azotat, fosfat și sulfat și se completează acestea până la nivelul din mediul de cultură lichid Zarrouk inițial. Mediu lichid recuperat F2 completat se folosește pentru cultivarea autotrofă a microalgelor, reluându-se ciclul de cultivare continuă.

## REVENDICĂRI

1. Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea că** include următoarele etape: cultivarea autotrofă a micro-algelor într-un fotobioreactor tubular, pe un mediu mineral, care include, după primul ciclu, mediu lichid recirculat F2; recoltarea biomasei de alge cultivate pe mediu autotrof prin electro-floculare și flotație, cu recuperarea mediului lichid F1 și utilizarea acestuia pentru mediul lichid mixotrof de cultivare a micro-algelor; ruperea celulelor de microalge separate prin flotație prin omogenizare la înaltă presiune; extragerea lipidelor din omogenizatului de micro-alge, prin folosire de solvenți organici, urmată de recuperarea prin distilare a solvenților și separarea lipidelor; trans-esterificarea lipidelor, cu recuperarea glicerinei brute care este utilizată, după aducere la pH neutru cu acid fosforic, ca sursă de carbon pentru suplimentarea mediului mixotrof de cultivare a algelor, în concentrație de 2 g/l; hidroliza enzimatică a biomasei delipidizate cu un amestec de hidrolaze, fosfataze, nucleaze, proteaze și amidopeptidaze; separarea prin centrifugare la 8.000 x g a materialului micro-algal rezistent la hidroliză enzimatică M1, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, și prelucrarea ulterioară a acestui material la bio-cărbune; normalizarea hidrolizatului de proteine și acizi nucleici prin ultrafiltrare tangențială; cultivarea algelor unicelulare pe mediu mixotrof, obținut prin suplimentarea mediului mineral F1 recuperat, cu glicerină brută și hidrolizate de proteină și acizi nucleici micro-algali; recoltarea biomasei de alge cultivate pe mediu mixotrof prin electrofloculare și flotare, cu separarea mediului lichid F2 și a biomasei de micro-alge cultivate mixotrof; omogenizarea la înaltă presiune a biomasei de alge și extragerea lipidelor din omogenizatului de micro-alge, prin folosire de solvenți organici, urmată de recuperarea prin distilare a solvenților și separarea lipidelor; trans-esterificarea lipidelor extrase, cu recuperarea glicerinei brute care este utilizată, după aducere la pH neutru cu acid fosforic, ca sursă de carbon pentru suplimentarea adițională a mediului mixotrof de cultivare a algelor, în concentrație adițională de 3 g/l; hidroliza enzimatică a biomasei delipidizate cu un amestec de hidrolaze, proteaze, amidopeptidaze și β-glucaze; separarea prin centrifugare a materialului micro-algal rezistent la hidroliză enzimatică M2, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, și prelucrarea ulterioară a acestui material la bio-cărbune; concentrarea hidrolizatului de proteine, oligozaharide și fitohormoni prin evaporare în vid, uscarea concentratului de extract enzimatic micro-algal prin



pulverizare și granulara pulberii rezultate în pat fluidizat; purificarea mediului lichid filtrat F2 prin trecere pe bio-cărbunele obținut din material M1 și M2, în raport de 3 g bio-cărbune la 1 litru de mediu, determinarea conținutului de azotat, fosfat și sulfat în mediu lichid recuperat F2, purificat prin trecere pe biocărbune, și completarea acestora până la nivelul din mediul de cultură lichid inițial, și utilizarea mediului lichid filtrat F2 pentru cultivarea autotrofă a micro-algelor.

2. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** etapa de cultivare autotrofă a micro-algelor pe un mediu mineral se realizează până la o densitate de minim 7,5 g/l biomasă, cu cel puțin 20% lipide, inițial pe mediu Zarrouk și apoi pe mediu mineral care include după primul ciclu mediu lichid recirculat F2 purificat și completat cu nutrienți minerali la nivelul mediului Zarrouk, într-un fotobioreactor tubular, amplasat parțial sub fotobioreactorul operat mixotrof și parțial umbrit de acesta, menținut în condiții de seră, la  $22\pm 2^\circ\text{C}$  în timpul zilei și  $17\pm 2^\circ\text{C}$  în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, iluminat cu lumina solară, cu intensități care ating  $800 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  în timpul amiezii, suplimentată cu lumină cu intensitatea de  $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scade sub  $500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  și aerat cu 10 litri de amestec gazos cu 5%  $\text{CO}_2$  pe min pe 100 litri de mediu.

3. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** etapa de recoltare a biomasei de alge, cultivate pe mediu autotrof sau mixotrof, se realizează prin electro-floculare și flotare, folosind o celulă electrolică de flotare cu electrozi plăți și perforați, din oțel carbon OLC 10, cu max. 0,1% C, situați la o distanță de 5 cm unul de altul, aplicându-se tensiunea necesară pentru a avea o intensitate a curentului transmis de 1,33 A, la o energie specifică consumată de  $0,359 \text{ kWhm}^{-3}$ .

4. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** etapa de rupere a celulelor de alge unicelulare, cultivate autotrof sau mixotrof, se realizează prin trecere pe un omogenizator cu piston prevăzut cu valvă acoperită cu nailon funcționalizat cu polimeri conținând amine terțiare, poli-dimetilaminometilstiren, 3 cicluri la 150 MPa.

5. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** etapa de extragere a lipidelor din omogenatul de alge unicelulare, cultivate autotrof sau mixotrof se face cu hexan, în raport de 1 parte solvent organic la 1 parte omogenat.

6. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** etapa de hidroliză a proteinelor și a acizilor nucleici din biomasa algală cultivată autotrof, delipidizată, se realizează cu un amestec de hidrolaze, inițial cu un amestec format din 0,25 părți

proteină activitate specifică endonucleazică de  $1 \times 10^6$  unități endonuclează / mg proteină, și 0,25 părți proteină cu activitate specifică de 300 unități fosfatază/mg proteină, la 1000 părți biomasă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată, timp de 12 ore la 45°C și pH 6,5, urmat de tratamentul cu 0,1 părți proteine având activitatea specifică proteazică de 2,4 unități Anson (AU) per gram și 0,1 g părți proteine cu o activitate specifică aminopeptidazică de 500 LAPU/g la 1000 părți biomasă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată, la pH 6,5 și temperatura de 60°C, timp de 16 ore.

7. Procedeu conform revendicării **1 caracterizat prin aceea că** etapa de normalizare a hidrolizatului de proteine și acizi nucleici se face prin ultrafiltrare tangențială pe o membrană cu limita de excludere de 5 kDa, până la 5% azot total și 1,5% fosfor total, cu utilizarea acestor hidrolizate ca sursă de azot și fosfor pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor, în concentrație de 12,5 g/l.

8. Procedeu conform revendicării **1 caracterizat prin aceea că** etapa de conversie în bio-cărbune și bio-ulei a materialului lignocelulozic micro-algal rezistent la hidroliză enzimatică M1 și, respectiv M2, se face prin piroliza asistată de micro-unde, la o putere incidentă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub vacuum, care inițial este de 30 mbari, și care crește până la 0,3 bari la punctul maxim de încălzire.

9. Procedeu conform revendicării **1 caracterizat prin aceea că** etapa de cultivare mixotrofă a micro-algelor pe mediu recuperat F1, suplimentat cu glicerină în concentrație inițială de 2 g/l și apoi de 5 g/l, și cu 12,5 g/l hidrolizat de proteine și acizi nucleici, cu 5% N și 1,5% P, până la atingerea unei densități de biomasă de min. 7,5 g/l, cu un conținut de lipide de cel puțin 30%, într-un fotobioreactor tubular, amplasat parțial deasupra fotobioreactorului operat autotrof, menținut în condiții de seră, la  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  în timpul zilei și  $17 \pm 2^\circ\text{C}$  în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, iluminat cu lumina solară, cu intensități care ating  $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  în timpul amiezii, suplimentată cu lumină cu intensitatea de  $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scade sub  $500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  și aerat cu 20 litri de amestec gazos cu 7,5%  $\text{CO}_2$  pe min pe 100 litri de mediu;

10. Procedeu conform revendicării **1 caracterizat prin aceea că** etapa de hidroliză a proteinelor și a pereților celulari din biomasă algală cultivată mixotrof, delipidizată, se realizează cu un amestec de hidrolaze, inițial cu un amestec format din 0,25 părți complex de hidrolaze produs de *Trichoderma viride*, cu 200 unități  $\beta$ -glucan *Botrytis*

per g, la pH 5, temperatura de 50°C, la 1000 părți biomasă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată, timp de 12 ore la 50°C și pH 5, urmat de tratamentul cu 0,1 părți proteine având activitatea specifică proteazică de 2,4 unități Anson (AU) per gram și 0,1 g părți proteine cu o activitate specifică aminopeptidazică de 500 LAPU/g la 1000 părți biomasă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată, la pH 6,5 și temperatura de 60°C, timp de 16 ore.

11. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** etapa de concentrare a hidrolizatului de proteine, oligozaharide și fitohormoni se realizează prin evaporare în vid până la 10% substanță uscată determinată refractometric a extractului enzimatic, uscarea concentratului de extract enzimatic micro-algal prin pulverizare, la o temperatură de intrare de 150...165°C și la o temperatură de ieșire de 75..80°C, și granulara pulberii rezultate în pat fluidizat, format prin injectarea de aer la o presiune de 2,5 bari și cu un debit de 65 ...85 m<sup>3</sup>/h, și operat la o temperatură de 55°C în timpul umectării prin stropire cu soluție de alcool etilic 15% pentru aglomerare și de 75°C în timpul uscării granulelor poroase formate.

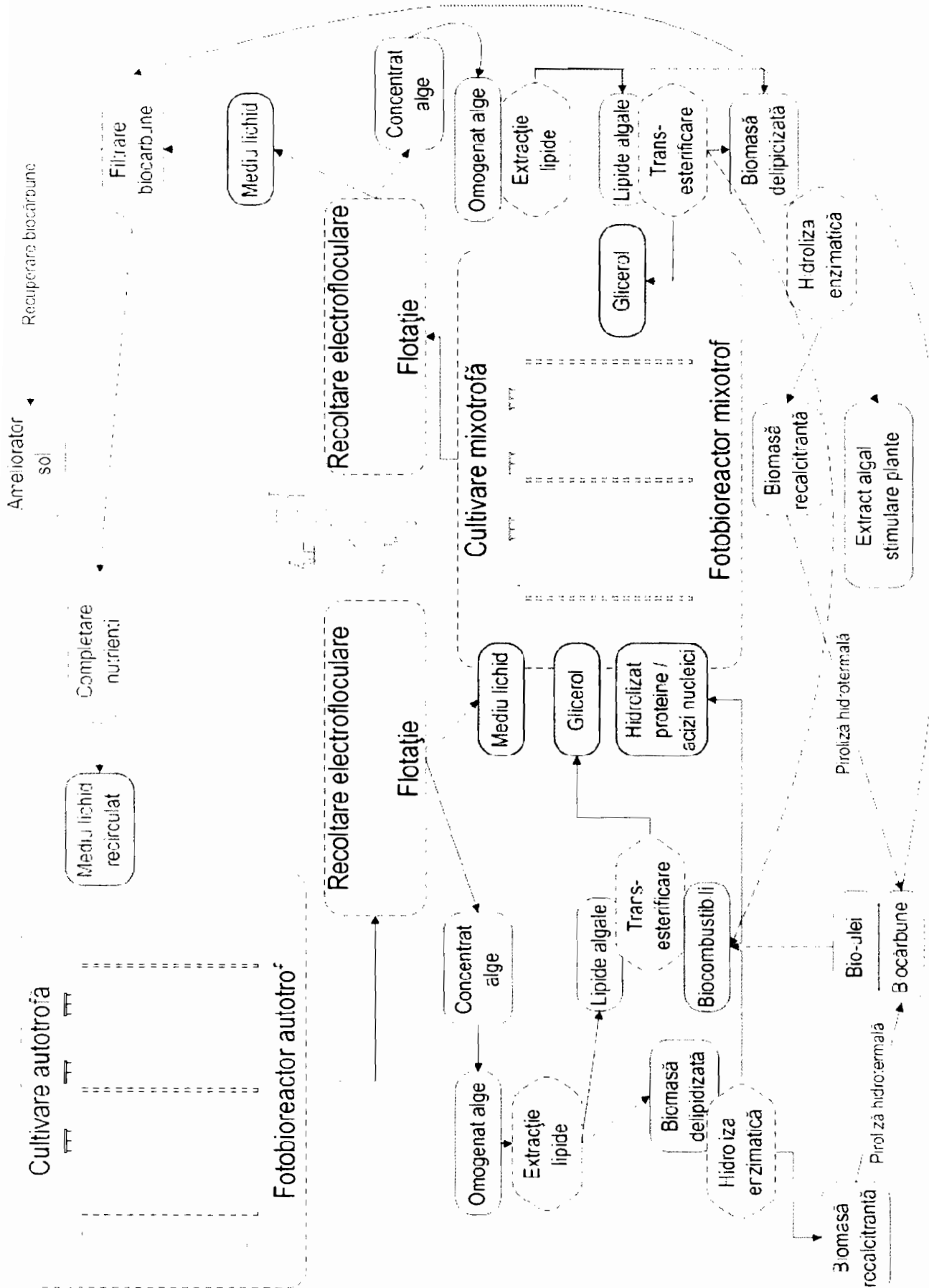


Figura 1

528