



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00896**

(22) Data de depozit: **25/11/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/12/2017** BOPI nr. **12/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2015 BOPI nr. **6/2015**

(73) Titular:
• **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.Cc 6, SC.A, ET.3, AP.12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ILIE LUCIA, BD.TIMIȘOARA NR.49,
BL.Cc 6, SC.A, ET.4, AP.14, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RU 2460771 (C1); WO 2010/123848 (A2);
US 2013/0217084 (A1)**

(54) **PROCEDEU DE CULTIVARE MIXOTROFĂ A ALGELOR
UNICELULARE**



RO 130353 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de cultivare mixotrofă a algelor unicelulare, pe un mediu mineral suplimentat cu glicerol, și hidrolizate de proteine și acizi nucleici,
3 destinat obținerii de biomasă algală utilizabilă pentru producerea de biocombustibili, inclusiv biocombustibil pentru aviație.

5 Se cunosc diferite procedee mixotrofe de cultivare a algelor unicelulare, care implică suplimentarea mediilor de cultură minerale cu diferiți compuși organici.

7 **RU 2460771 (C1)** se referă la o metodă de extracție a substanțelor bioactive din biomasa algelor unicelulare din genul *Chlorella*, care cuprinde extracția lipidelor-pigment cu un
9 solvent organic, benzină sau etanol, la temperatura camerei, timp de 3...5 h, filtrarea extractului, evaporarea solventului din porțiunea solubilă și formarea unui complex lipid-pigment
11 uscat, amestecarea părții insolubile a extractului cu preparatele enzimatiche de tipul celor celulozice și proteazice, urmată de hidroliza enzimatică timp de 4...8 h, la pH 4..6, la o temperatură cuprinsă între 50...65°C, centrifugarea hidrolizatului și uscarea părților solubile și
13 insolubile, cu obținerea de produse uscate.

15 **WO 2010/123848 (A2)** dezvăluie un procedeu care implică formarea unei culturi algale, prin combinarea unor populații de alge care au capacitatea de a supraviețui și prolifera pe ape industriale uzate, pe un mediu cu ape industriale uzate suplimentat, opțional, cu
17 o sursă de carbon reprezentată de glucoză, zaharoză, fructoză, glicerol, metanol, acetat sau hidrolizat lignocelulozic, ca și de orice altă combinație a acestora. Lipidele extrase din algele
19 astfel cultivate se pot converti în biodiesel sau alte produse organice.

21 **US 2013/0217084 (A1)** 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,
23 prin care se obține biomasă de alge unicelulare cu un conținut ridicat de acizi grași omega-3.

25 **WO 2012/035262 (A1)** descrie un procedeu mixotrof de cultivare a algelor în prezența unei surse de lumină discontinuă, sub formă de flash-uri. Mediul de creștere este
27 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/h, au amplitudine
29 egală sau superioară la $10 \text{ pEm}^{-2}\text{s}^{-1}$, și o durată cuprinsă între 20 s și 10 min, de preferat între 10 s și 2 min, și mai exact între 20 s și 1 min. Prin acest procedeu se acumulează
31 cantități de biomasă cuprinse între 100 și 150 g/l, cu un conținut de lipide cu peste 30% mai ridicat decât cel din celulele acelorși alge cultivate autotrof, iar timpul de cultivare se reduce la mai puțin de 40 h.

33 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
35 din fotosintetizatul organismelor terestre, în condițiile în care această suplimentare s-ar putea realiza prin reutilizarea unor compuși proveniți din prelucrarea biomasei algale, recoltată
37 inclusiv din medii mixotrofe suplimentate cu surse de carbon, azot și fosfor provenite din biomasă de alge unicelulare.

39 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 carbon și fosfor - a se vedea, de exemplu,
41 review-ul Chisti, 2013, J. Biotech., 167: 2012-214.

43 Problema tehnică pe care urmărește să o rezolve invenția este utilizarea compușilor proveniți din prelucrarea biomasei algale, respectiv a glicerolului brut, rezultat de la
45 transesterificarea lipidelor algale, ca sursă de carbon, precum și a hidrolizatelor de proteine și acizi nucleici din biomasa de alge unicelulare, ca sursă de azot și fosfor, pentru suplimentarea mediului de cultură mixotrof.
47

RO 130353 B1

Obiectul invenției se referă la un procedeu prin care se obțin hidrolizatele de proteine și acizi nucleici din biomasa de alge unicelulare, folosite pentru suplimentarea mediului autotrof.	1 3
Procedeu conform invenției este alcătuit din următoarele etape:	
- recoltarea biomasei de alge cultivate pe mediu mixotrof și ruperea celulelor de alge unicelulare prin omogenizare la înaltă presiune;	5
- extragerea lipidelor din omogenizatului algal, folosind amestec de solvenți, urmată de recuperarea prin distilare a solvenților și separarea lipidelor;	7
- transesterificarea lipidelor prin procedee cunoscute, cu recuperarea glicerolului brut care este utilizat, după aducere la pH neutru cu acid fosforic, ca sursă de carbon pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor, în concentrații cuprinse între 2 și 5 g/l;	9 11
- hidroliza enzimatică a biomasei lipidice cu un amestec de hidrolaze, fosfataze, nucleaze, proteaze și celulaze, urmată de separarea prin centrifugare a materialului algal rezistent la hidroliza enzimatică, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, și de prelucrarea ulterioară a acestui material la furani și acid levulinic utilizabili pentru obținerea de biocombustibili;	13 15
- 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 ca sursă de azot și fosfor pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor, în concentrație de 12,5 g/l;	17 19
- cultivarea algelor unicelulare pe mediu mineral suplimentat 16 g/l NaHCO ₃ , glicerină brută în concentrație cuprinsă între 2 și 5 g/l și 12,5 g/l hidrolizat de proteine și acizi nucleici, cu 5% N și 1,5% P, pe un mediu aerat cu 1...10 l de amestec gazos cu 7% CO ₂ /min/100 l de mediu, la temperatura de 28°C și la intensități ale iluminării cuprinse între 250 și 1000 μEm ⁻² s ⁻¹ , timp de 2...5 zile, până la atingerea concentrației de 100 g/l biomasă algală, urmată de recoltarea biomasei algale.	21 23 25
Procedeu conform invenției prezintă următoarele avantaje:	27
- creșterea cantității de biomasă de alge unicelulare și de lipide în biomasa de alge, datorită suplimentării mediului de cultivare cu surse organice de carbon, azot și fosfor;	29
- stimularea creșterii algelor datorită acumulării de fitohormoni algali și de aminoacizi precursori ai fitohormonilor algali în hidrolizatele enzimaticice de biomasă algală delipidizată;	31
- adaptarea la condiții de mediu adverse, reprezentate de intensități ridicate ale iluminării și de concentrații ridicate de CO ₂ în gazele de aerare a mediului de cultură, datorită acumulării de compuși osmoprotectanți, în special prolină, în hidrolizatele enzimaticice de biomasă algală delipidizată;	33 35
- utilizarea prin reciclare în cadrul procedurii de cultivare mixotrof a glicerolului brut și a fracțiilor de proteine și acizi nucleici din biomasa algală, a produselor secundare de la procesarea lipidelor și carbohidraților din biomasa algală în biocombustibili.	37
Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:	39
- recoltarea prin centrifugare la minimum 8000 x g, și ruperea celulelor de alge unicelulare prin trecere pe un omogenizator cu piston, prevăzut cu valvă tip muchie de cuțit, 3 cicluri la 150 MPa;	41
- extragerea lipidelor din omogenatul de alge unicelulare cu un amestec de cloform:metanol 2:1, în raport de 5 părți amestec solvenți la 1 parte omogenat;	43
- hidroliza proteinelor și a acizilor nucleici din biomasa algală delipidizată cu un amestec de hidrolaze, inițial cu un amestec format din 0,25 părți proteină activitate specifică endonucleazică de 1 x 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 h la 45°C și pH 6,5, urmat de tratamentul cu	45 47 49

RO 130353 B1

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

5 În continuare, se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără să o
limiteze.

7 Exemplul 1

Se recoltează biomasa algală după cultivare într-un fotobioreactor Biostat PBR 2S
9 (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germania), prin centrifugare pe o centrifugă continuă
de laborator Westfalia Laboratory Separator, model SA 1-02-175 (GEA Westfalia Separator
11 Group, Oelde, Germania), care este operată la o viteză a discurilor de centrifugare de
10000 rpm, echivalent a 8500 x g; la o rată de alimentare de 0,3 l/min, cu separarea continuă
13 a mediului de cultură clarificat și discontinuă a unui concentrat de alge, ajuns la o densitate
de 1100 kg/m³. Concentratul de biomasă algală se omogenizează într-un omogenizator cu
15 piston, GEA Niro Soavi Arriete NS2006 (GEA Niro Soavi, Parma, Italia), prevăzut cu o valvă
tip „muchie de cuțit”, două cicluri la 150 MPa, câte 0,3 l/min. Omogenizarea la înaltă presiune
17 determină ruperea celulelor algale prin liză indusă de variațiile de presiune, și trecerea prin
valva tip „muchie de cuțit”, cu exprimarea conținutului celular și expunerea pereților celulari.

19 Din omogenizatul algal se extrag lipidele cu un amestec de cloform:metanol 2:1, în
raport de 5 părți amestec solvenți la 1 parte omogenat. Lipidele se transesterifică prin folo-
sirea unui catalizator bazic, alcoxid de potasiu. 100 părți de ulei algal reacționează în auto-
21 clavă, sub atmosferă protectoare de azot, și la 40°C, timp de 8 h, 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
23 este adus la pH neutru prin neutralizare cu acid fosforic, și utilizarea acestuia ca sursă de
carbon pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor.

25 Transesterificarea 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
27 de potasiu, și utilizarea acestuia ca sursă de carbon pentru suplimentarea mediului de
cultivare a algelor.

29 Acizii nucleici și proteinele din biomasa algală delipidizată se hidrolizează cu un
amestec de hidrolaze. Inițial se tratează 1000 părți biomasă algală delipidizată, care are o
31 umiditate reziduală de peste 80%, cu un amestec format din 0,25 părți proteină cu activitate
specifică endonucleazică de 1×10^6 unități endonuclează/mg proteină (circa 0,28 părți de
33 Benzonase, purity grade II > 90%, Merck Millipore, Darmstadt, Germania, amestec de endo-
nucleaze din *Serratia marcescens* obținut prin exprimarea genelor specifice în *E. coli*) și
35 0,25 părți proteină cu activitate specifică de 300 unități fosfatază/mg proteină (circa 0,5 părți
din fosfataza alcalină purificată din cultură de *Bacillus licheniformis* MTCC 1483, conform
37 procedurii descris de Pandey și Banik, 2011, Biores. Technol., 102: 4226-4231), timp de
39 12 h, 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,
41 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,
43 pH 8,0, 0,1 mg/ml BSA, 1 mM MgCl₂, incubare la 37°C. O unitate de fosfatază alcalină este
definită ca fiind acea cantitate de enzimă care determină, în condiții standard, eliberarea a
45 1 μmol 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/ml în tampon 1 M Tris-HCl, pH 10,0)
47 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.

RO 130353 B1

După hidroliza 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 g (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 g) 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 endoproteaze, obținut din *Aspergillus oryzae*, cu o activitate de 500 LAPU/g), la pH 6,5 și temperatura de 60°C, timp de 16 h. 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, digerează 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 rezistent la hidroliză enzimatică, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, se separă prin centrifugare, la 8000 x g, și se prelucrează ulterior la furani și acid levulinic utilizabili pentru obținerea de biocombustibili.

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).

Cultivarea algelor unicelulare se realizează pe mediu mineral Z, Zarouk, suplimentat cu 16 g/l NaHCO₃, și mediu Zarouk mixotrof, suplimentat cu 16 g/l NaHCO₃, glicerină brută în concentrație cuprinsă între 2 și 5 g/l și 12,5 g/l hidrolizat de proteine și acizi nucleici, cu 5% N și 1,5% P, ale căror formule sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos.

Tabelul 1

Compoziția mediului nutritiv Zarouk și a mediului Zarouk suplimentat cu glicerină și hidrolizat din proteine algale (Zarouk mixotrof)

Compoziții mediu	Zarouk	Zarouk mixotrof
NaHCO ₃	16,80 g/l	16,80 g/l
K ₂ HPO ₄	0,50 g/l	0,50 g/l
NaNO ₃	1,875 g/l	1,875 g/l
Hidrolizat cu conținut 5% azot și 1,5% fosfor	-	12,5
Glicerină	-	42770

RO 130353 B1

Tabelul 1 (continuare)

Compozenți mediu	Zarouk	Zarouk mixotrof
K ₂ SO ₄	1,00 g/l	1,00 g/l
NaCl	1,00 g/l	1,00 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,20 g/l	0,20 g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,04 g/l	0,04 g/l
Soluție de microelemente*	1 ml	1 ml
Soluție de Fe chelatat**	5 ml	5 ml

*Micronutrienți soluție stoc (g/l): H₃BO₃, 2,860; MnSO₄ · 4H₂O, 2,030; ZnSO₄ · 7H₂O 0,222; MoO₃ (85%) 0,018; Cu SO₄ · 5H₂O 0,079; Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0,494.

** Pentru prepararea soluției stoc de Fe chelatat, s-au dizolvat în 80 ml de apă distilată 0,69 g de FeSO₄ · 7H₂O și 0,93 g Na₂ EDTA. După fierbere pentru o scurtă durată de timp și răcire la temperatura camerei, soluția finală se aduce la un volum de 100 ml.

Într-un fotobioreactor Biostat PBR 2S (Sartorius Stedim Biotech), se introduc 2,7 l de mediu nutritiv Zarouk sau, respectiv, mediul Zarouk suplimentat cu 2 g glicerină și 12,5 g/l hidrolizat din proteine și acizi nucleici din alge (Zarouk mixotrof).

Condițiile de creștere în fotobioreactor sunt volumul de mediu: 3 l; temperatura de lucru: 28°C; iluminare 250 μEm⁻²s⁻¹, cu o fotoperioadă/alternanță ciclu iluminare: întuneric de 12:12 h; administrare de amestec sintetic de gaze cu compoziția: 7% CO₂, 14% O₂ și 79% N₂, la un debit de 30 ml/min, corespunzând la o aerare cu 1 l de amestec gazos cu 7% CO₂/min/100 l de mediu; viteza pompei de recirculare a pompei peristaltice 70%, respectiv un debit de recirculare de 3500 ml/min; se programează din softul bioreactorului măsurarea automată a parametrilor de lucru, respectiv pH, turbiditate (OD), temperatură, lumină, viteza de recirculare, debit de CO₂/aerare cu amestec sintetic de gaze.

Mediul de creștere se inoculează cu 300 ml de inocul din cultură de tulpinii *Nannochloris* sp 424-1, minimum 10⁹ ufc/ml. Se cultivă timp de 5 zile, până la atingerea concentrației de 100 g/l biomasă algală, urmată de recoltarea biomasei algale. Rezultatele medii care se obțin sunt prezentate în tabelul 2 de mai jos.

Tabelul 2

Creșterea autotrofă și mixotrofă a tulpinii *Nannochloris* sp 424-1 pe fotobioreactor Biostat PBR 2S, la iluminare 250 μEm⁻²s⁻¹, cu o fotoperioadă 12 h

Parametrii de creștere	Cultură autotrofă	Cultură mixotrofă
Rata exponențială creștere, R _{exp} , zile ⁻¹	284	655
Timp de dublare, TD, zile	244	106
Conținut lipide în biomasă uscată, % (g/100 g)	214	208

Exemplul 2

Se procedează ca în exemplul 1, cu diferența că se utilizează pentru cultivare un sistem integrat fotosintetizator original, descris pe larg în brevetul RO 0123480. În esență, acest sistem fotosintetizator original este compus dintr-un corp central sub formă de cuvă deschisă la partea superioară, în care sunt amplasate un număr variabil de celule de fotosinteză, legate în paralel prin conducte de alimentare cu soluții nutritive (sau soluții nutritive + masă algală sau masă algală adusă la stadiul de creștere exponențială), respectiv prin conducte

RO 130353 B1

de alimentare cu gaze având conținut variabil de dioxid de carbon. Deasupra cuvei fotobioreactorului se află amplasat sistemul de iluminare. Sistemul fotobioreactor integrat îmbină avantajele sistemului deschis de tip iaz, cu cele ale sistemului cu plăci plane, putând fi încadrat în clasa fotobioreactoarelor hibride. Pentru testarea creșterii tulpinii s-au încărcat celulele de fotosinteză cu mediu de cultură Zarouk cu 16,8 g/l NaHCO₃, sau cu mediu Zarouk suplimentat cu 5 g/l glicerină și 12,5 hidrolizat din acizi nucleici și proteine din alge (mediu mixotrof), și inoculul proaspăt preparat, în raport volumetric 9:1. Încărcarea s-a făcut până la umplerea celulelor de fotosinteză, astfel încât fluidul alimentat să deverseze în fotobioreactor, peste deversoarele de prea-plin. S-a cuplat sistemul de iluminare și apoi s-a introdus prin conducta de alimentare amestecul de gaze cu dioxid de carbon, vehiculat de suflanta S8, cu un debit prestabilit, care să permită barbotarea și să mențină o bună agitare a suspensiei în celulele de fotosinteză.

Experimentele se realizează în condiții de seră, la 22 ± 2°C în timpul zilei și 17 ± 2°C în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 h. În condiții de laborator, iluminarea s-a realizat cu lămpi de halogen, la 250 μE m⁻²s⁻¹. În condiții de seră, se utilizează lumina solară, cu intensități care ating 1100 μE m⁻²s⁻¹ în timpul amiezii, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160 μE m⁻²s⁻¹, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scade sub 500 μE m⁻²s⁻¹. Se efectuează determinări ale ratei exponențiale de creștere și ale timpului de dublare (Wood et al., 2005. *Algal culturing techniques*, 269-285), ale conținutului de lipide (Bligh și Dyer, 1959, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917) și de carotenoizi (Wright și Jeffrey, 1997, în Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds), *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, Unesco Publishing, Paris, pp. 327-341). Rezultatele medii care se obțin sunt prezentate în tabelul 3 de mai jos.

Tabelul 3

Creșterea autotrofă și mixotrofă a tulpinii Nannochloris sp 424-1 pe sistem integrat fotosintetizator, la iluminare 500 -1101 μEm⁻²s⁻¹, cu o fotoperioadă de 12 h

Parametri de creștere	Cultură autotrofă	Cultură mixotrofă
Rata exponențială creștere, R _{exp} , zile ⁻¹	655	723
Timp de dublare, TD, zile	106	72
Conținut lipide în biomasă uscată, % (g/100 g)	208	246

Aceste rezultate care sunt obținute susțin eficiența procedurii de cultivare mixotrofă propus, pentru creșterea randamentelor de cultivare a algelor unicelulare, cu reciclarea azotului și fosforului din proteinele și acizii nucleici din biomasa algală, neutilizați pentru bio-combustibili.

1. Procedeu conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: recoltarea biomasei de alge cultivate pe mediu mixotrof, ruperea celulelor de alge unicelulare prin omogenizare la înaltă presiune, extragerea lipidelor din omogenizatului algal, prin folosire de amestec de solvenți, recuperarea prin distilare a solvenților și separarea lipidelor, transesterificarea lipidelor prin procedee cunoscute, cu recuperarea glicerolului brut care este utilizat, după aducere la pH neutru cu acid fosforic, ca sursă de carbon pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor, în concentrații cuprinse între 2 și 5 g/l, hidroliza enzimatică a biomasei lipidice cu un amestec de hidrolaze, fosfataze, nucleaze, proteaze și celuloze, separarea prin centrifugare a materialului algal rezistent la hidroliza enzimatică, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, și prelucrarea ulterioară a acestui material la furani și acid levulinic, utilizabili pentru obținerea de bio-combustibili, 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 ca sursă de azot și fosfor pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor, în concentrație de 12,5 g/l, cultivarea algelor unicelulare pe mediu mineral suplimentat cu 16 g/l NaHCO₃, glicerina brută în concentrație cuprinsă între 2 și 5 g/l și 12,5 g/l hidrolizat de proteine și acizi nucleici, cu 5% N și 1,5% P, pe un mediu aerat cu 1...10 l de amestec gazos cu 7% CO₂/min/100 l de mediu, la temperatura de 28°C și la intensități ale iluminării cuprinse între 250 și 1000 μEm⁻²s⁻¹, timp de 2...5 zile, până la atingerea concentrației de 100 g/l biomasă algală, urmată de recoltarea biomasei algale.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** recoltarea biomasei de alge se realizează prin centrifugare la minimum 8000 x g, iar ruperea celulelor de alge unicelulare se realizează prin trecere pe un omogenizator cu piston prevăzut cu valvă tip muchie de cuțit, 3 cicluri la 150 MPa.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extragerea lipidelor din omogenatul de alge unicelulare se face cu un amestec de cloroform: metanol 2:1, în raport de 5 părți amestec solvenți la 1 parte omogenat.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** hidroliza proteinelor și a acizilor nucleici din biomasă algală delipidizată se face cu un amestec de hidrolaze, inițial cu un amestec format din 0,25 părți proteină activitate specifică endonucleazică de 1 x 10⁶ 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 h 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 g 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 h.

