



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENTIE

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

(22) Data de depozit: **25.11.2013**

(41) Data publicării cererii:
30.06.2015 BOPI nr. **6/2015**

(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 MIXOTROFĂ A ALGELOR UNICELULARE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de cultivare a unor alge unicelulare. Procedeul conform inventiei constă în recoltarea biomasei de alge cultivate pe mediu mixotrof, și ruperea celulelor de alge unicelulare, prin omogenizare la înaltă presiune, urmată de extragerea lipidelor din omogenizatul algal, și separarea acestora, care sunt apoi supuse procesului de transesterificare, cu recuperarea glicerolului brut utilizat în concentrație de 2...5 g/l, ca sursă de carbon pentru suplimentarea mediului de cultivare a algelor unicelulare, biomasa lipidică este supusă hidrolizei enzimatiche, din care rezultă un

hidrolizat de proteine și acizi nucleici care, după normalizare, sunt utilizati în concentrație de 12,5 g/l ca sursă de azot și fosfor, în amestec cu 16 g/l NaHCO₃, și sursă de carbon, ca mediu de cultivare a algelor unicelulare care se realizează pe un mediu aerat cu 1...10 l amestec gazos la o temperatură de 28°C și o intensitate a iluminării de 250...1000 µEm⁻²s⁻¹, timp de 2..5 zile, până la o concentrație de 100 g/l biomasă algală, urmată de recoltarea biomasei algale.

Revendicări: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



PROCEDEU DE CULTIVARE MIXOTROFĂ A ALGELOR UNICELULARE

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, destinat obținerii de biomasă algală utilizabilă pentru producerea de biocombustibili, inclusiv biocombustibil pentru aviație.

Sunt cunoscute diferite brevete care se referă la diferite procedee mixotrofe de cultivare a algelor unicelulare, care implică suplimentarea mediilor de cultură minerale cu diferiți compuși organici. Cererea de brevet WO 2010/123848 dezvăluie un procedeu de 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, optional, 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 discontinui, 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 $10 \text{ pEm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 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 fotosintezatul organismelor terestre, în condițiile în care această suplimentare s-ar putea realiza prin re-utilizarea 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 carbon și fosfor – a se vedea de ex. review-ul Chisti, 2013, J. Biotech., 167:2012-214.

Este un obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu de cultivare mixotrofă a algelor unicelulare, în care sunt utilizati, pentru suplimentarea mediului de cultură autotrof, compușii proveniți din prelucrarea biomasei algale procesate pentru obținerea de biocombustibili, respectiv glicerolul brut, rezultat de la transesterificarea lipidelor algale, ca sursă de carbon, și hidrolizatele de proteine și acizi nucleici din biomasa de alge unicelulare, 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, folosite pentru suplimentarea mediului autotrof.

Procedeul 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;
- ✓ Extragerea lipidelor din omogenizatul algal, prin folosire de amestec de solvenți, urmată de 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 celulaze, urmată de separarea prin centrifugare a materialului algal rezistent la hidroliză enzimatică, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, și de 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 litri de

amestec gazos cu 7% CO₂ pe min pe 100 litri 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.

Aspectele preferate ale procedeului descris mai sus sunt:

- ✓ Recoltarea prin centrifugare la min. 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;
- ✓ 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;
- ✓ 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 1×10^6 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 biomășă algală delipidizată, exprimată ca substanță uscată, la pH 6,5 și temperatură de 60°C, timp de 16 ore;

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Acumularea superioară de biomășă de alge unicelulare și de lipide în biomășă de alge, datorită suplimentării mediului de cultivare cu surse organice de carbon, azot și fosfor;
- Stimularea creșterii algelor datorită acumulării de fitohormoni algali și de aminoacizi precursori ai fitohormonilor algali în hidrolizatele enzimatiche de biomășă algală delipidizată;
- Favorizarea adaptării la condiții de mediu adverse, reprezentate de intensități ridicate ale iluminării și de concentrații ridicate de CO₂ în gazele de aerare a mediului de cultură, datorită acumulării de compuși osmoprotectori, în special prolină, în hidrolizatele enzimatiche de biomășă algală delipidizată;
- Utilizarea prin reciclare în cadrul procedeului de cultivare mixotrof a glicerolului brut și a fracțiilor de proteine și acizi nucleici din biomășă algală, produse secundare de la procesarea lipidelor și carbohidraților din biomășă algală în biocombustibili.

In continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limită.

Exemplul 1. Se recoltează biomasa algală după cultivare într-un fotobioreactor Biostat PBR 2S (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germania), prin centrifugare 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 $8500 \times g$; la o rată de alimentare de 0,3 litri/min, cu separarea continuă a mediului de cultură clarificat și discontinuă a unui concentrat de alge, ajuns la o densitate de 1100 kg/m^3 . Concentratul de biosă algală se omogenizează într-un omogenizator cu 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 litri/min. Omogenizarea la înaltă presiune 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 celulați.

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 folosirea unui catalizator bazic, alcooxid 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.

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 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 biomasă algală delipidizată, care are o umiditate reziduală de peste 80%, cu un amestec format din 0,25 părți proteină cu activitate specifică endonucleazică de 1×10^6 unități endonuclează / mg proteină (cca 0,28 părți de Benzonase, purity grade II >90%, Merck Millipore, Darmstadt, Germania, amestec de endonucleaze din *Serratia marcensens*, 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 procedeului 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 absorbanței 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 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 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 fofatază 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 temperatură 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 initială care produce într-un minut o cantitate de compuși solubili în acid tricloracetic care dau aceeași culoare cu reactivul Folin-Ciocâlteu 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 substrate, 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 Prostak (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 preleveză probe în care se analizează periodic pentru conținutul azot total folosind metoda Kjedahl (EN 13342-2001) și după extragere în apă regală (EN 13346-2000).

Cultivarea algelor unicelulare se realizează pe mediu mineral Z, Zarouk, suplementat cu 16 g/l NaHCO₃, și mediu Zarouk mixotrof, suplementat 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 tab.1 de mai jos.

Tab. 1. Compoziția mediului nutritiv Zarrouk și a mediului Zarouk suplementat cu glicerină și hidrolizat din proteine algale (Zarouk mixotrof).

Componenți 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	-	2 - 5
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 dizovat în 80 ml de apă distilată 0,69 g de FeSO₄ · 7H₂O și 0,93g Na₂EDTA. Dupa fiebere pentru o scurtă durată de timp și racire la temperatură camerei se aduce soluția finală la un volum de 100 ml.

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

Condiții de creștere în fotobioreactor sunt volumul de mediu: 3 l; temperatura de lucru: 28°C; iluminare $250 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu o fotoperioadă / alternanță ciclu iluminare : întuneric de 12:12 ore; administrare de amestec sintetic de gaze cu compoziția: 7% CO_2 , 14% O_2 și 79% N_2 la un debit de 30 ml/min, corespunzând la o aerare cu 1 litru de amestec gazos cu 7% CO_2 pe min pe 100 litri de mediu; viteza pompei de recirculare a pompei peristaltice 70%, respectiv un debit de recirculare de 3500 ml/min; se programează din softul bioreactorului masurarea automată a parametrilor de lucru respectiv: pH, turbiditate (OD), temperatură, lumină, viteza de recirculare, debit de CO_2 / aerare cu amestec sintetic de gaze.

Mediul de creștere se inoculează cu 300 ml de inocul din cultură de tulpinii *Nannochloris* sp 424-1, min. 10^9 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 tab. 2 de mai jos.

Tab. 2. Creșterea autotrofă și mixotrofă a tulpinii *Nannochloris* sp 424-1 pe fotobioreactor Biostat PBR 2S, la iluminare $250 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu o fotoperioadă 12 ore.

Parametrii de creștere	Cultură autotrofă	Cultură mixotrofă
Rata exponențială creștere, R_{exp} , zile ⁻¹	0,284	0,655
Timp de dublare, TD, zile	2,44	1,06
Conținut lipide în biomasă uscată, % (g/100 g)	21,4	20,8

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 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 fotobioreactoarelор hibride. Pentru testarea creșterii tulpinii s-au

încarcat 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-au introdus prin conducta de alimentare amestecul de gaze cu dioxid de carbon, vehiculate 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 ore. 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 tab. 3 de mai jos.

Tab. 2. 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 ore.

Parametrii de creștere	Cultură autotrofă	Cultură mixotrofă
Rata exponențială creștere, R _{exp} , zile ⁻¹	0,655	0,723
Timp de dublare, TD, zile	1,06	0,72
Conținut lipide în biomasă uscată, % (g/100 g)	20,8	24,6

Aceste rezultate care se obțin susțin eficiența procedeului 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 neutilizată pentru biocombustibili.

Revendicări

1. Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: recoltarea biomasei de alge cultivate pe mediu mixotrof și ruperea celulelor de alge unicelulare prin omogenizare la înaltă presiune; extragerea lipidelor din omogenizatul algal, prin folosire de amestec de solventi, urmată de recuperarea prin distilare a solventilor 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 celulaze, urmată de separarea prin centrifugare a materialului algal rezistent la hidroliză enzimatică, constituit predominant din (ligno)celuloză recalcitrantă, și de 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, 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 litri de amestec gazos cu 7% CO₂ pe min pe 100 litri de mediu, la temperatura de 28°C și la intensități ale iluminării cuprinse între 250 și 1000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 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 prin centrifugare se face la la min. 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 cloform: metanol 2:1, în raport de 5 părți amestec solventi la 1 parte omogenat;
4. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** hidroliza proteinelor și a acizilor nucleici din biomasa algală delipidizată se face cu un

- 2 0 1 3 0 0 8 9 6 -
2 5 -11- 2013

24

amestec de hidrolaze, inițial cu un amestec format din 0,25 părți proteină activitate specifică endonucleazică de 1×10^6 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 temperatură de 60°C, timp de 16 ore.