



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00452**

(22) Data de depozit: **30/07/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2023 BOPI nr. 1/2023

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

(72) Inventatori:
• **PAULENCO ANCA, STR.SANDULEȘTI,
NR.1, BL.Z11, SC.1, ET.5, AP.66,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **GĂLAN ANA MARIA, ȘOS.SĂLAJ, NR.349,
BL.1, SC.A, ET.5, AP.46, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VINTILĂ ALIN CRISTIAN NICOLAE,
STR.ALEXANDRU LĂPUȘNEANU, NR.19,
BL.7, SC.A, AP.1, PLOIEȘTI, PH, RO;**
• **VLAICU ALEXANDRU,
STR.MIHAIL SADOVEANU, NR.1, BL.B25,
SC.B, ET.1, AP.4, SLOBOZIA, IL, RO;**
• **VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO**

(54) **PROCEDEU DE TRATARE A FLUXURILOR REZIDUALE DIN
INDUSTRIA LACTATELOR PRIN CULTIVARE ÎN REGIM
MIXOTROF A TULPINII MICROALGALE NANNOCHLORIS SP.**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de tratare a fluxurilor reziduale din industria lactatelor. Procedeu, conform invenției, constă în cultivarea în regim mixotrof a tulpinii microalgale *Nannochloris sp.*, utilizând 2,5...10 g/L lactoză din zer obținut ca flux secundar la fabricarea de brânzeturi, ca sursă de carbon organic și barbotare de aer îmbogățit cu 7% CO₂ ca sursă de carbon anorganic, într-un fotobioreactor prevăzut cu sursă de iluminare reglabilă, termostatare și sistem de barbotare gaz, în cicluri alternative de 12 h iluminare naturală/artificială și 12 h întuneric, la temperatura de 28 ± 1°C, cu adaosul

unui volum de zer corespunzător unei concentrații de 2,5...10g/L lactoză, raportată la volumul total de mediu nutritiv, după 7 zile de cultivare rezultând o reducere de 99...100% a conținutului de lactoză, de până la 96% a consumului chimic de oxigen, de până la 91% a conținutului de azot, respectiv, 70% a conținutului de fosfor și o creștere a cantității de biomasă microalgală de până la 138%.

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 invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



**PROCEDEU DE TRATARE A FLUXURILOR REZIDUALE DIN INDUSTRIA
LACTATELOR PRIN CULTIVARE IN REGIM MIXOTROF A TULPINII MICROALGALE
NANNOCHLORIS SP.**

Prezenta invenție se referă la un procedeu inovativ de tratare a fluxurilor reziduale din industria lactatelor prin cultivare în regim mixotrof a tulpinii microalgale *Nannochloris sp.*, mai exact prin reducerea încărcăturii organice a zerului generat ca produs secundar la fabricarea de brânzeturi.

Zerul este supus unei etape de deproteinizare din care rezultă proteina din zer cu valoare nutrițională ridicată pentru utilizare în formulări de suplimente alimentare. Zerul deproteinizat este apoi utilizat ca atare, fără a necesita pretratament suplimentar, pentru îmbogățirea mediului nutritiv de cultivare a tulpinilor microalgale. Adăugarea zerului în mediul specific de cultivare se face raportat la cantitatea de lactoză prezentă în zer, pentru a obține concentrații cuprinse între 2,5 și 10 g/L lactoză în formularea finală a mediului nutritiv. Prin adăugarea acestor volume de zer în mediul nutritiv, concentrația de biomasă microalgala crește cu până la 138% comparativ cu proba martor, iar după 7 zile de cultivare, lactoză este consumată în proporție de peste 99%, consumul chimic de oxigen este redus cu până la 96%, iar conținutul de azot și fosfor scade cu 91% respectiv 70%.

Tulpinile microalgale utilizează încărcătura fluxului secundar (în principal carbon, azot și fosfor) pentru a se dezvolta, sintetizând diverse tipuri de compuși utilizând aceste elemente ca și elemente constructive (carbohidrați, lipide, antioxidanți etc.). Astfel, la sfârșitul procesului de cultivare a microalgelor, încărcătura fluxului secundar este redusă și în același timp se obține o biomasă cu potențial ridicat de valorificare.

Microalgele, organisme fotosintetizatoare cunoscute pentru abilitatea lor de a sechestra durabil dioxidul de carbon, au fost studiate intens în ultimii 20 de ani pentru potențialul lor ca bioresurse alternative pentru energii regenerabile. Este cunoscută capacitatea lor de a crește în diferite medii, apă de mare, apă dulce, ape reziduale și de a produce, intra și extracelular, un mare număr de componente bioactive valoroase cum ar fi lipide, antioxidanți, pigmenți, proteine, vitamine, steroli și carbohidrați (*Villarruel-López et al., 2017, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 67:251-263*)

Multiplele studii referitoare la posibilitatea de ridicare la scară a cultivării și valorificării biomasei microalgale subliniază că acest proces poate fi rentabil doar dacă este integrat în conceptul de biorafinare, caz în care costurile ridicate necesare cultivării (în principal consumul energetic necesar recoltării biomasei microalgale) sunt compensate de obținerea unuia sau mai multor produse cu valoare ridicată (*Chew et al., 2017,*

Bioresource Technology, 229:53-62). De asemenea, pentru a reduce costurile procesului de cultivare a biomasei microalgale, se pot utiliza fluxuri secundare bogate in nutrienti care sa inlocuiasca adaosul de saruri si microelemente necesare dezvoltarii microalgelor.

Astfel, daca procedeul de tratare a apelor uzate provenite de la fabricarea branzeturilor prin sisteme microalgale este implementat in cadrul industriei lactatelor, biomasa obtinuta in urma epurarii acestor fluxuri poate fi valorificata pentru obtinere de diverse produse cu valoare adaugata ridicata precum suplimente alimentare, nutreturi, ingrediente pentru industria cosmetica, pigmenti pentru industria alimentara etc.

Zerul este un flux secundar rezultat de la fabricarea branzeturilor, acesta reprezentand in jur de 90% din cantitatea de lapte prelucrat, astfel obtinandu-se in cantitati foarte mari. Acest flux secundar este foarte bogat din punct de vedere nutritional, continand, in principal, lactoza si cazeina, dar si multiple vitamine, minerale si microelemente.

Datorita cantitatilor mari in care se obtine acest flux, interesul a crescut in directia dezvoltarii de metode de valorificare a acestuia, nu doar pornind de la elementele valoroase pe care le contine, dar si de la impactul semnificativ pe care deversarea acestuia o are asupra mediului inconjurator. Consumul biologic de oxigen are o valoare foarte ridicata comparativ cu alte fluxuri secundare industriale, astfel fiind foarte periculos pentru mediul acvatic la deversare directa. De asemenea, aplicarea zerului pe sol conduce la mineralizarea excesiva a acestuia si implicit la imposibilitatea de a fi folosit pentru culturi agricole.

Microalgele sunt capabile sa utilizeze acest flux secundar ca sursa de nutrienti pentru dezvoltare. Unul dintre dezavantajele utilizarii microalgelor pentru epurarea fluxurilor secundare industriale este imposibilitatea utilizarii biomasei microalgale, obtinute la sfarsitul procesului de cultivare, pentru aplicatii alimentare sau cosmetice, aplicatii in care compusii extrasi din aceasta biomasa prezinta valoarea cea mai ridicata. Aceasta incompatibilitate cu aplicatiile alimentare este data de divesiile compusi daunatori prezenti in majoritatea fluxurilor secundare, precum metale grele, hormoni, antibiotice, etc.

Utilizarea zerului rezultat din industria lactatelor elimina acest dezavantaj, microalgele folosind astfel ca sursa de nutrienti un flux secundar alimentar, care nu prezinta contaminantii mai sus mentionati si astfel biomasa microalgala obtinuta poate fi prelucrata pentru obtinere de compusi pretabili ca ingrediente pentru industria alimentara sau a cosmeticelor (antioxidanti, pigmenti, acizi grasi polinesaturati etc.).

Clorofila este un pigment verde indispensabil in natura deoarece este responsabil de procesul de fotosinteza. Extractia acestui pigment a capatat un interes deosebit datorita cererii de pigmenti naturali pentru industria alimentara, antioxidanti in domeniul

farmaceutic si cosmetic. Carotenoidele sunt o clasa de pigmenti terpenoizi colorati care se impart in continuare in doua clase, a hidrocarburilor (caroteni) si a derivatilor oxigenati (xantofile) cu proprietati puternic antioxidante (*Rajesh et al., 2017, Algal Green Chemistry, Elsevier, 139-147*).

Principalele carotenoide de interes bio-sintetizate microalgal sunt: luteina, care mentine integritatea celulara si protejeaza celulele de diverse tipuri de stres, astaxantina, canthaxantina, si fucoxantina antioxidanti puternici, considerati ketocarotenoide ce prezinta un mare interes pentru aplicatii biotehnologice, luteina, β -caroten si licopen. Carotenoidele sunt sintetizate in cloroplaste si se acumuleaza in materialul vegetal numai in anumite conditii de stres. Carotenoidele prezinta proprietati valoroase care deschid posibilitatea aplicatiilor in domeniul sanatatii umane, antioxidanti naturali, degenerarea adusa de inaintarea in varsta, boli neuro-degenerative, dispepsie, hipertensiune, normalizeaza functionarea musculara si cardiaca etc. In principal, acestea protejeaza celulele de efectele distructive le radicalilor liberi (*Minhas et al., 2016, Frontiers in microbiology, 7:546-546*).

Stimularea acumularii de carotenoide prin bio-sinteza microalgala se poate face prin inducerea unor anumite conditii de stres in procesul de cultivare a microalgelor, atat in conditii autotrofe, cat si in conditii heterotrofe. Principalul factor de stres care afecteaza acumularea de carotenoide este stresul foto-oxidativ, cauzat de lipsa de nutrienti, iradiere si fotosinteza excesiva. In conditii de crestere autotrofa, factorii de stres foto-oxidativ care determina acumularea carotenoidelor in biomasa microalgala sunt temperatura crescuta, intensitatea luminii si perioada de expunere, sursa limitata de azot si salinitate mediului de cultivare. In conditii heterotrofe si mixotrofe, acumularea de compusi valorosi este data de disponibilitatea sursei externe de carbon, glucoza, pe care microalgele o utilizeaza pentru a biosintetiza astaxantina sau luteina. In cazul speciilor microalgale, pentru cresterea randamentului in biomasa, lipide si carotenoide, sunt preferate conditiile mixotrofe (*Minhas et al., 2016, Frontiers in microbiology, 7:546-546*).

Brevetul de inventie **US 10865371 B2** se refera la un procedeu de cultivare mixotrofa a microalgelor intr-un sistem de bioreactoare, cu adaos de carbon organic (provenit din diverse surse de ape cu incarcatura organica) si barbotare de oxigen in sistem, si care prezinta zone iluminate si zone de intuneric, intre care este circulata suspensia microalgala.

Brevetul de inventie **US 2020/032182 A1** se refera la cultivarea microalgelor folosind ape uzate, provenite de la productia fructelor deshidratate si a vinului, ape ce prezinta un consum biologic de oxigen ridicat care poate fi redus prin cultivarea heterotrofa a microalgelor (folosesc zaharurile din apa uzata ca sursa de carbon) cu obtinere de biomasa microalgala bogata in compusi bioactivi. Prezenta inventie se distinge prin faptul ca fluxul rezidual utilizat provine din industria lactatelor.

Brevetul de inventie **CN 110643514 A** se refera o metoda de cultivare a tulpinii microalgale *Porphyridium* sp. microalgelor folosind ape uzate provenite din acvacultura, imbogatite cu carbon prin barbotare ce CO₂ in mediul de cultivare. Prezenta inventie se distinge prin faptul ca fluxul rezidual utilizat provine din industria lactatelor, ca sursa de carbon organic.

Brevetul de inventie **CN 111748479 A** se refera la o metoda de cultivare a microalgelor folosind ape uzate de la productia de bere sau dejectii de vita ca surse de carbon organic. Brevetul de inventie **CN 111944735 A** se refera la o metoda de imbunatatire a productivitatii in biomasa microalgala (*Desmodesmus* sp.), prin utilizarea ca sursa de nutrienti a apelor uzate provenite de la crescatoriile de vite sau pasari. Brevetul de inventie **CN 211896548 U** se refera la o metoda de purificare a apelor uzate provenite de la crescatoriile de vite si pasari. Aceste brevete de inventie mentionate utilizeaza fluxuri reziduale de la crescatorii de animale, pe cand prezenta inventie trateaza fluxuri reziduale din industria lactatelor.

Brevetul de inventie **CN 112499886 A** se refera la o metoda de recuperare a carbonului, azotului si fosforului din apele uzate municipale folosind sisteme microalgale. Prezenta inventie se distinge prin faptul ca fluxul rezidual utilizat provine din industria lactatelor.

Brevetul de inventie **US 2007/191303 A1** se refera la o metoda de cultivare mixotrofa a biomasei microalgale adaugand diferite procente de glicerina in mediul de cultura, in scopul stimulării productiei de polizaharide intra si extracelulare. Cererea de brevet de inventie **RO 130353 A2** se refera la un procedeu de cultivare a tulpinii microalgale *Nannochloris* sp. utilizand glicerina ca sursa de carbon anorganic. Prezenta inventie se distinge prin faptul ca utilizeaza lactoza prezenta in zer in scopul stimulării cresterii productivitatii microalgale.

Brevetul de inventie **KR 2019/0041805 A** se refera la un procedeu de cultivare a unor tulpini microalgale in zer rezultat de la prepararea branzeturilor, care este supus unui pretratament cu acid si apoi cu hidrolaze, anterior cultivării microalgelor (*Aurantiochytrium* sp.), pentru a obtine monozaharide (glucoza si galactoza) pe care microalgele sa le foloseasca drept sursa de carbon organic. Dezavantajul acestei inventii este ca prevede etape de pretratament a zerului, inainte de cultivarea tulpinii microalgale, mai elaborate si costisitoare decat prezenta inventie.

In general, brevetele de inventie ce utilizeaza tulpina microalgala *Nannochloris* sp. se axeaza pe metode de crestere a productivitatii de ulei microalgal pentru obtinere de biodiesel: **RO 130353 A2**, **WO 2012/125611 A2**, **WO 2013/005209 A2**, **KR 101428863 B1**. Prezenta inventie se distinge prin faptul ca se utilizeaza tulpina microalgala *Nannochloris* sp. in scopul epurării fluxurilor reziduale de la fabricarea lactatelor.

Nici unul dintre brevetele identificate anterior nu se refera la utilizarea tulpinii microalgale *Nannochloris sp.* in scopul tratarii fluxurilor reziduale din industria lactatelor ca urmare a capacitatii acesteia de a consuma incarcatura organica drept nutrient in scopul producerii de biomasa bogata in compusi utili.

Prezenta inventie are ca obiect descrierea unui procedeu prin care se realizeaza valorificarea continutului de lactoza din zerul obtinut in urma productiei de branzeturi, prin utilizarea acestuia la prepararea mediului nutrient pentru cresterea microalgelor, astfel inlocuind nutrientii specifici adaugati ca saruri anorganice pentru dezvoltarea microalgelor.

În cadrul prezentei inventii este descris unui procedeu de cultivare a unei tulpini microalgale capabile sa utilizeze lactoza prezenta in fluxul secundar mentionat pentru dezvoltare si sintetizare de diversi compusi bioactivi cu valoare adaugata ridicata, precum pigmenti, antioxidanti, proteine si acizi grasi polinesaturati.

Prezenta inventie descrie, de asemenea, unui procedeu de intensificare a productiei de biomasa microalgala prin asigurarea unei surse suplimentare de nutrienti mediul de cultivare, si anume carbon (lactoza), azot si fosfor, obtinandu-se o crestere a cantitatii de biomasa microalgala de pana la 138%.

Un alt obiect al prezentei inventii este reducerea valorilor continutului de lactoza, azot si fosfor din zerul rezultat ca flux secundar din industria lactatelor, utilizand sisteme microalgale, realizand astfel un pretratament al acestui flux care, deversat ca atare, prezinta efecte negative asupra mediului, in mod deosebit asupra mediilor acvatice.

Cultivarea tulpinii microalgale se realizeaza intr-un fotobioreactor tubular SARTORIUS 25S, autoclavabil, volum util 3 L, lungime serpentina 6 m, construit din sticla, prevazut cu sistem reglabil de iluminare compus din lampi fluorescente de 18 W, senzor de temperatura, pH, densitate optica, oxigen dizolvat, termostatare, sistem de barbotare gaz (aer imbogatit cu 7% CO₂) in mediul de cultura si sistem de reglaj al pH-ului prin introducerea de acid/baza in sistem.

Cultivarea se realizeaza folosind tulpina **424-1 de *Nannochloris sp.***, din colectia proprie a Institutului National de Cercetare-Dezvoltare pentru Chimie si Petrochimie ICECHIM Bucuresti, depozitata sub numarul CCAP 251/10 la *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP), SAM Research Services Ltd., Scottish Marine Institute, Aryll, UK.

Cultivarea se realizeaza folosind un regim de iluminare care consta in cicluri alternative de 12 ore iluminare si 12 ore intuneric, concomitent cu suplimentarea mediului nutrient cu carbon organic si anorganic. Iluminarea se face cu lumina solara (naturala), cu intensitati care ating 800 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ în timpul amiezii, suplimentata cu lumina cu intensitatea de 160 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, provenita din lampile cu halogen din dotarea

fotobioreactorului, atunci când intensitatea luminoasă scade sub $500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Acest regim de iluminare permite microalgelor să sintetizeze, în perioada de iluminare, molecule de baza, prin fotosinteza, folosind elementele prezente în mediul nutritiv, iar în etapa de întuneric, să prelucreze aceste molecule de baza în compuși cu masă moleculară mai mare, precum pigmenți, carbohidrați, proteine, lipide etc. Cultivarea se realizează timp de 7 zile, la temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, menținută prin termostatare, barbotare de aer îmbogățit cu 7% CO_2 , și se porneste de la mediul de cultivare specific tulpinii utilizate, prezentat în cele ce urmează.

Tulpina microalgala **424-1 de *Nannochloris* sp.**: Inoculul necesar efectuării experimentărilor se prepară în pahare Erlenmeyer, timp de 8-10 zile, la temperatura ambientală, până la faza exponențială de creștere. Monitorizarea spectrofotometrică a extincției probelor recoltate zilnic pe lungimea de undă 678 nm a permis identificarea punctului de trecere de la faza creșterii inductive la perioada creșterii exponențiale a tulpinii investigate. După atingerea fazei de creștere exponențială, inoculul a fost adăugat în fotobioreactor la un raport volumetric de 1 volum inocul la 9 volume mediu nutritiv Zarrouk (Tabel 1).

Tabel 1. Compoziția mediului nutritiv Zarrouk.

Compoziții mediu	Zarrouk
NaHCO_3	16,80 g/l
K_2HPO_4	0,50 g/l
NaNO_3	1,875 g/l
K_2SO_4	1,00 g/l
NaCl	1,00 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,04 g/l
Soluție de microelemente*	1 ml
Soluție de Fe chelatat**	5 ml

* Micronutrienți soluție stoc (g/l): H_3BO_3 , 2,860; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,030; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,222; MoO_3 (85%) 0,018; $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,494.

** Pentru prepararea soluției stoc de Fe chelatat s-au dizolvat în 80 ml de apă distilată 0,69 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 0,93g Na_2EDTA . După fierbere pentru o scurtă durată de timp și răcire la temperatura camerei se aduce soluția finală la un volum de 100 ml.

Mediul nutritiv final pentru cultivarea tulpinii microalgale selectate va fi compus din mediul specific de cultivare al acesteia (Zarrouk) cu adaosul unui volum de zer corespunzător unei concentrații de lactoză cuprinsă între 2,5 - 10 g/L, raportată la întregul volum de mediu nutritiv dorit. Raportarea se face astfel deoarece zerul poate prezenta valori diferite ale concentrației de lactoză, astfel volumul necesar asigurării concentrației între 2,5 - 10 g/L poate varia în funcție de proveniența zerului.

Pentru a asigura o reproductibilitate mai buna a datelor, si o corelare mai buna a acestora cu realitatea epurarii zerului ca flux secundar rezultat din industria lactatelor, pentru realizarea experimentarilor nu a fost folosita lactoza, ci a fost folosit zerul asa cum rezulta el de la fabricarea branzeturilor, cu mentiunea ca s-a realizat deproteinizarea acestuia in prealabil.

Anterior utilizarii pentru cultivarea microalgelor, zerul este supus unei etape de sterilizare / deproteinizare din care rezulta proteina din zer cu valoare nutritionala ridicata pentru utilizare in formulari de suplimente alimentare. Deproteinizarea se face prin aducerea zerului la temperatura de fierbere si mentinerea la aceasta temperatura timp de 15 minute, urmata de racire treptata pentru a facilita precipitarea proteinei, care este indepartata din volumul de zer prin centrifugare si filtrare. Proteina din zer este mai departe spalata cu apa distilata si uscata prin procesul de liofilizare.

Zerul deproteinizat este apoi analizat din punct de vedere fizico-chimic (**Tabelul 2**) si utilizat ca atare, fara a necesita pretratament suplimentar, pentru imbogatirea cu nutrienti a mediului specific de cultivare a tulpinilor microalgale. Adaugarea zerului in mediul specific de cultivare se face raportat la cantitatea de lactoza prezenta in zer, pentru a se obtine o concentratie cuprinsa intre 2,5 si 10 g/L lactoza in formularea finala a mediului nutrient.

Inocularea volumului de mediu Zarouk completat cu cantitatea corespunzatoare de zer se face in fotobioreactor, adaugand intai volumul de mediu nutrient – 9 parti din volumul total, apoi volumul de inocul microalgal – 1 parte din volumul total.

Se asigura monitorizarea zilnica a parametrilor de cultivare (temperatura, pH, densitate optica). Curba de crestere a biomasei microalgale se realizeaza prin masurarea zilnica a densitatii optice a suspensiei microalgale, cu ajutorul unui SPECTROFOTOMETRU UV VIS TIP ULTRA 3600 RIGOL, cu dublu fascicul, domeniu lungimi de unda: 190-1100 nm.

Tabelul 2. Caracterizare fizico-chimica a zerului deproteinizat utilizat pentru prepararea mediului nutrient.

Parametru (u.m.)	Valoare
Consum chimic de oxigen (mg/L)	68.300
Azot total (mg/L)	280
Fosfor total (mg/L)	1.228
Lactoza (g/L)	61
pH	6,08
NaCl (%)	2,50

Recoltarea microalgelor din mediul de cultivare se face cu ajutorul unei centrifuge de laborator HETTICH ROTINA 420R cu camera de centrifugare din otel. Dupa indepartarea supernatantului, uscarea probelor de biomasa microalgala se realizeaza utilizand un echipament de liofilizare MARTIN CHRIST - ALPHA 1-2 PLUS, pentru solide sau lichide, cu o capacitate de condensare de pana la 4 kg/24 h si temperatura de pana la -60°C, display LCD de control, prevazut cu pompa de vid cu capacitate de absorbtie de minim 2 m³/h si presiune finala de pana la 5 x 10⁻³.

Supernatantul indepartat in urma centrifugarii este analizat din punct de vedere fizico-chimic, pentru a determina gradul in care au fost consumati contaminantii acestuia, urmarindu-se in principal continutul de lactoza si consumul chimic de oxigen.

Biomasa microalgala este supusa unui proces de extractii succesive pentru separarea si analiza compusilor bioactivi de interes. Primul proces de extractie se refera la obtinerea pigmentilor sintetizati de biomasa microalgala, utilizand acetona ca solvent. Urmatorul proces de extractie la care este supusa biomasa microalgala este separarea fractiei lipidice, utilizand un amestec 2:1 metanol:cloroform. Aceste metode sunt adaptari ale metodelor prezentate in literatura (**Hosikian et al., International Journal of Chemical Engineering, 2010: 391632; Sati et al., 2019, Algal Research, 38:101413**). Fractia lipidica este prelucrata in vederea analizei cantitative si calitative a acizilor grasi sintetizati de tulpina microalgala in conditiile date, utilizand o metoda dezvoltata in cadrul colectivului de lucru din care fac parte autorii (**Galan et al., 2017, Revista de Chimie, 68(4):671-674**).

Avantajele prezentului procedeu:

Se realizeaza tratarea zerului, un flux secundar de provenienta agro-industrială, prin reducerea, in 7 zile de cultivare a microalgelor, cu peste 99% a continutului de lactoza, cu peste 96% a consumului chimic de oxigen. Continutul de azot este redus in proportie de peste 91%, iar cel de fosfor cu pana la 70%.

Tulpina utilizata pentru procesul descris in prezenta inventie, 424-1 de *Nannochloris sp.*, prezinta marele avantaj de a se dezvolta intr-un ritm mai rapid decat alte tulpini microalgale, astfel timpul necesar cultivarii biomasei microalgale, implicit timpul necesar consumului de contaminanti din mediul de cultivare, este redus la jumatate (7 zile fata de 14).

Prin adaugarea unui volum de zer in mediul nutrient, calculat la o cantitate cuprinsa intre 2,5 si 10 g/l lactoza, productivitatea in biomasa microalgala obtinuta, comparativ cu procesul de cultivare fara adaos de zer, creste de la valoarea de 3,09 g biomasa uscata per litru de suspensie pana la valoarea de 7,34 g/L, in cazul completarii mediului de cultivare cu zer calculat ca 10 g/L lactoza in mediul de cultivare, datorita asigurarii unei surse de carbon organic si nutrienti.

Prezenta lactozei in mediul de cultivare favorizeaza acumularea acizilor grasi nesaturati, in mod deosebit mononesaturati (C18:1) si cu dubla nesaturare (C16:2, C18:2).

Procedeeul poate fi aplicat in mod continuu. Dupa 7 zile de cultivare, lactoza este consumata in totalitate, putand fi adaugata inca o portie de zer, calculata din nou la valori cuprinse intre 2,5 si 10 g/L lactoza, pentru tratament continuu al unor volume cat mai mari de zer.

Exemplu de realizare a inventiei (1):

- Tulpina microalgala **424-1 de *Nannochloris* sp.**;
- Mediu cultivare: mediu specific Zarouk (Tabel 1) cu adaos de zer deproteinizat;
- Cantitate lactoza in mediul final de cultivare: 2,5 g/L;
- Timp de cultivare: 7 zile;
- Temperatura de cultivare: $28 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Barbotare de aer imbogatit cu 7% CO₂ in mediul de cultivare;
- Iluminare cicluri alternative de 12 ore iluminare si 12 ore intuneric.

Mediul de cultivare imbogatit in zer, calculat la cantitatea de lactoza de 2,5 g/L biomasa microalgala (9 parti), irmpreuna cu inoculul tulpinii microalgale (1 parte) sunt introduse in fotobioreactor si sunt setate conditiile de lucru stabilite (temperatura, schema de iluminare).

Se porneste pompa care asigura recircularea suspensiei microalgale prin sistemul de cultivare si se incepe monitorizarea parametrilor cu ajutorul senzorilor cu care este prevazut fotobioreactorul.

Dupa cele 7 zile de cultivare, fotobioreactorul este evacuat si biomasa microalgala este recoltata prin centrifugare si uscata prin liofilizare. Productivitatea in biomasa este de 3,93 g/L, cu 27% mai mare fata de proba martor (3,09 g/L biomasa microalgala), obtinuta in aceleasi conditii, fara adaos de zer in mediul de cultivare.

Supernatantul separat prin centrifugare este analizat in ceea ce priveste consumul chimic de oxigen, continutul de lactoza, azot si fosfor, pentru determinarea reducerii acestor parametri prin cultivarea tulpinii microalgale. Se constata o reducere a consumului chimic de oxigen de 90%, cantitatea de lactoza este consumata in totalitate, continutul de azot este redus in proportie de 51% iar fosforul in proportie de 54%.

Biomasa microalgala uscata este supusa unui proces de extractii succesive cu solvent: acetona pentru extractia pigmentilor (clorofila si carotenoizi) si metanol:cloroform in raport 2:1 pentru extractia fractiei lipidice. Biomasa cultivata cu 2.5 g/L lactoza prezinta

13,06% fracție lipidică cu următoarea distribuție a acizilor grași: acid palmitic (C16:0) – 15% din total acizi grași, hexadecadienoic (C16:2) – 14%, oleic (C18:1) – 7%, linoleic (C18:2) – 31% și linolenic (C18:3) – 20%. Pigmentii identificați sunt clorofila a – 6,13 mg/g, clorofila b – 2,42 mg/g și carotenoizi – 1,58 mg/g, cantități raportate la biomasa microalgala uscată.

Exemplu de realizare a invenției (2):

- Tulpina microalgala **424-1 de *Nannochloris* sp.**;
- Mediu cultivare: mediu specific Zarouk (Tabel 1) cu adaos de zer deproteinizat;
- Cantitate lactoză în mediul final de cultivare: 5 g/L;
- Timp de cultivare: 7 zile;
- Temperatura de cultivare: $28 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Barbotare de aer îmbogățit cu 7% CO₂ în mediul de cultivare;
- Iluminare cicluri alternative de 12 ore iluminare și 12 ore întuneric.

Mediul de cultivare îmbogățit în zer, calculat la cantitatea de lactoză de 5 g/L biomasa microalgala (9 părți), împreună cu inoculul tulpinii microalgale (1 parte) sunt introduse în fotobioreactor și sunt setate condițiile de lucru stabilite (temperatura, schema de iluminare).

Se porneste pompa care asigură recircularea suspensiei microalgale prin sistemul de cultivare și se începe monitorizarea parametrilor cu ajutorul senzorilor cu care este prevăzut fotobioreactorul.

După cele 7 zile de cultivare, fotobioreactorul este evacuat și biomasa microalgala este recoltată prin centrifugare și uscată prin liofilizare. Productivitatea în biomasa este de 4,95 g/L, cu 60% mai mare față de proba martor (3,09 g/L biomasa microalgala), obținută în aceleași condiții, fără adaos de zer în mediul de cultivare.

Supernatantul separat prin centrifugare este analizat în ceea ce privește consumul chimic de oxigen, conținutul de lactoză, azot și fosfor, pentru determinarea reducerii acestor parametri prin cultivarea tulpinii microalgale. Se constată o reducere a consumului chimic de oxigen de 94%, cantitatea de lactoză este consumată în totalitate, conținutul de azot este redus în proporție de 79% iar fosforul în proporție de 62%.

Biomasa microalgala uscată este supusă unui proces de extracții succesive cu solvent: acetona pentru extracția pigmentilor (clorofila și carotenoizi) și metanol:cloroform în raport 2:1 pentru extracția fracției lipidice. Biomasa cultivată cu 5 g/L lactoză prezintă 17,61% fracție lipidică cu următoarea distribuție a acizilor grași: acid palmitic (C16:0) – 16% din total acizi grași, hexadecadienoic (C16:2) – 9%, oleic (C18:1) – 34%, linoleic (C18:2) – 22% și linolenic (C18:3) – 6%. Pigmentii identificați sunt clorofila a – 3,25

mg/g, clorofila b – 1,78 mg/g si carotenoizi – 1,03 mg/g, cantitati raportate la biomasa microalgala uscata.

Exemplu de realizare a inventiei (3):

- Tulpina microalgala **424-1 de *Nannochloris* sp.**;
- Mediu cultivare: mediu specific Zarouk (Tabel 1) cu adaos de zer deproteinizat;
- Cantitate lactoza in mediul final de cultivare: 7,5 g/L;
- Timp de cultivare: 7 zile;
- Temperatura de cultivare: $28 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Barbotare de aer imbogatit cu 7% CO_2 in mediul de cultivare;
- Iluminare cicluri alternative de 12 ore iluminare si 12 ore intuneric.

Mediul de cultivare imbogatit in zer, calculat la cantitatea de lactoza de 7,5 g/L biomasa microalgala (9 parti), impreuna cu inoculul tulpinii microalgale (1 parte) sunt introduse in fotobioreactor si sunt setate conditiile de lucru stabilite (temperatura, schema de iluminare).

Se porneste pompa care asigura recircularea suspensiei microalgale prin sistemul de cultivare si se incepe monitorizarea parametrilor cu ajutorul senzorilor cu care este prevazut fotobioreactorul.

Dupa cele 7 zile de cultivare, fotobioreactorul este evacuat si biomasa microalgala este recoltata prin centrifugare si uscata prin liofilizare. Productivitatea in biomasa este de 6,64 g/L, cu 115% mai mare fata de proba martor (3,09 g/L biomasa microalgala), obtinuta in aceleasi conditii, fara adaos de zer in mediul de cultivare.

Supernatantul separat prin centrifugare este analizat in ceea ce priveste consumul chimic de oxigen, continutul de lactoza, azot si fosfor, pentru determinarea reducerii acestor parametri prin cultivarea tulpinii microalgale. Se constata o reducere a consumului chimic de oxigen de 94%, cantitatea de lactoza este consumata in proportie de 99,6%, continutul de azot este redus in proportie de 92% iar fosforul in proportie de 66%.

Biomasa microalgala uscata este supusa unui proces de extractii succesive cu solvent: acetona pentru extractia pigmentilor (clorofila si carotenoizi) si metanol:cloroform in raport 2:1 pentru extractia fractiei lipidice. Biomasa cultivata cu 7,5 g/L lactoza prezinta 21,89% fractie lipidica cu urmatoarea distributie a acizilor grasi: acid palmitic (C16:0) – 15% din total acizi grasi, hexadecadienoic (C16:2) – 8%, oleic (C18:1) – 33%, linoleic (C18:2) – 17% si linolenic (C18:3) – 15%. Pigmentii identificati sunt clorofila a – 1,82 mg/g, clorofila b – 1,83 mg/g si carotenoizi – 0,78 mg/g, cantitati raportate la biomasa microalgala uscata.

Exemplu de realizare a inventiei (4):

- Tulpina microalgala **424-1 de *Nannochloris sp.***;
- Mediu cultivare: mediu specific Zarouk (Tabel 1) cu adaos de zer deproteinizat;
- Cantitate lactoza in mediul final de cultivare: 10 g/L;
- Timp de cultivare: 7 zile;
- Temperatura de cultivare: $28 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Barbotare de aer imbogatit cu 7% CO_2 in mediul de cultivare;
- Iluminare cicluri alternative de 12 ore iluminare si 12 ore intuneric.

Mediul de cultivare imbogatit in zer, calculat la cantitatea de lactoza de 10 g/L biomasa microalgala (9 parti), impreuna cu inoculul tulpinii microalgale (1 parte) sunt introduse in fotobioreactor si sunt setate conditiile de lucru stabilite (temperatura, schema de iluminare).

Se porneste pompa care asigura recircularea suspensiei microalgale prin sistemul de cultivare si se incepe monitorizarea parametrilor cu ajutorul senzorilor cu care este prevazut fotobioreactorul.

Dupa cele 7 zile de cultivare, fotobioreactorul este evacuat si biomasa microalgala este recoltata prin centrifugare si uscata prin liofilizare. Productivitatea in biomasa este de 7,34 g/L, cu 138% mai mare fata de proba martor (3,09 g/L biomasa microalgala), obtinuta in aceleasi conditii, fara adaos de zer in mediul de cultivare.

Supernatantul separat prin centrifugare este analizat in ceea ce priveste consumul chimic de oxigen, continutul de lactoza, azot si fosfor, pentru determinarea reducerii acestor parametri prin cultivarea tulpinii microalgale. Se constata o reducere a consumului chimic de oxigen de 96%, cantitatea de lactoza este consumata in proportie de 99,4%, continutul de azot este redus in proportie de 91% iar fosforul in proportie de 70%.

Biomasa microalgala uscata este supusa unui proces de extractii succesive cu solvent: acetona pentru extractia pigmentilor (clorofila si carotenoizi) si metanol:clorofom in raport 2:1 pentru extractia fractiei lipidice. Biomasa cultivata cu 10 g/L lactoza prezinta 13,72% fractie lipidica cu urmatoarea distributie a acizilor grasi: acid palmitic (C16:0) – 16% din total acizi grasi, hexadecadienoic (C16:2) – 13%, oleic (C18:1) – 13%, linoleic (C18:2) – 26% si linolenic (C18:3) – 19%. Pigmentii identificati sunt clorofila a – 2,33 mg/g, clorofila b – 1,39 mg/g si carotenoizi – 0,83 mg/g, cantitati raportate la biomasa microalgala uscata.

PROCEDEU DE TRATARE A FLUXURILOR REZIDUALE DIN INDUSTRIA LACTATELOR PRIN CULTIVARE IN REGIM MIXOTROF A TULPINII MICROALGALE NANNOCHLORIS SP.

REVEDICARI

1. Procedeu de tratare a fluxurilor reziduale din industria lactatelor prin cultivare in regim mixotrof a tulpinii microalgale *Nannochloris sp.* caracterizat prin aceea ca include urmatoarele etape: cultivarea in regim mixotrof a tulpinii microalgale 424-1 de *Nannochloris sp.* utilizand ca sursa de carbon organic intre 2,5 – 10 g/L lactoza din zer, intr-un fotobioreactor tubular SARTORIUS 25S, cu volum util 3 L, timp de 7 zile, utilizand cicluri alternative 12 ore iluminare cu lumina solara (naturala), cu intensitati care ating 800 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suplimentata cu lumina cu intensitatea de 160 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, provenita din lampile cu halogen din dotarea fotobioreactorului, atunci când intensitatea luminoasă scade sub 500 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, si 12 ore intuneric, la temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, mentinuta prin termostatare, cu barbotare de aer imbogatit cu 7% CO_2 ca sursa de carbon anorganic, utilizand ca mediu nutrient pentru cultivarea tulpinii microalgale selectate mediul specific de cultivare al acesteia (Zarouk) cu adaosul unui volum de zer corespunzator unei concentratii de lactoza cuprinsa intre 2,5 - 10 g/L, raportata la intregul volum de mediu nutrient.
2. Procedeu conform revendicarii 1 caracterizat prin aceea ca dupa 7 zile de cultivare a tulpinii microalgale in mediul imbogatit cu zer, continutul de lactoza al mediului este redus in proportie de 99-100%.
3. Procedeu conform revendicarii 1 caracterizat prin aceea ca dupa 7 zile de cultivare a tulpinii microalgale in mediul imbogatit cu zer, consumul chimic de oxigen (COD) al mediului este redus cu pana la 96%, continutul de azot total este redus cu pana la 91% iar continutul total de fosfor este redus cu pana la 70%.
4. Procedeu conform revendicarii 1 caracterizat prin aceea ca adaugarea unui volum de zer corespunzator unei cantitati de lactoza cuprinsa intre 2,5 si 10 g/L in mediul de cultivare a tulpinii microalgale asigura o crestere a cantitatii de biomasa microalgala cu pana la 138% (10 g/L lactoza in mediu) comparativ cu proba martor.