

RAPORT STIINTIFIC FINAL

„Produse cu valoare adăugată din biomasa microalgala aplicând concepte de biorefinare – AlgaeBioref”

Contract nr. TE 181/2020

Scopul proiectului „AlgaeBioref” îl reprezintă obținerea de produse cu valoare ridicată (antioxidanți, lipide și carbohidrați) din biomasa microalgala utilizând conceptul de biorafinare. Prin adoptarea conceptului ”zero deseuri”, proiectul și-a propus conversia biomasei epuizate de principii active în biocarbone cu proprietăți adsorbante, ce a fost testat în vederea reținerii de compuși anorganici. Conținutul proiectului include activități inovative multidisciplinare de optimizare a condițiilor de creștere a microalgelor, respectiv de extracție a compusilor de interes, și de transformare eficientă a acestora în compuși cu valoare adăugată mare utilizând sisteme catalitice dezvoltate în cadrul proiectului.

Obiectivul principal al proiectului îl reprezintă extragerea produselor cu valoare adăugată din biomasa microalgala aplicând conceptul de biorefinare.

1. Obiectivele prevazute/realizate

Obiectivele prevazute în cadrul proiectului de cercetare au fost realizate integral pe parcursul celor trei etape. Obiectivele prevazute/realizate au fost următoarele:

- Compararea a două tulpini de microalge și selectarea celei care furnizează cea mai mare cantitate de antioxidanți, lipide și carbohidrați în condiții optime de creștere.
- Prelucrarea biomasei microalgale prin metode de extracție convenționale și neconvenționale.
- Prelucrarea compusilor de interes extrasi din biomasa microalgala pentru a sintetiza substanțe chimice cu valoare adăugată cu diverse aplicații.

În cadrul *etapei nr. 1* s-a realizat un model experimental de cultivare a unei tulpini algale (*Dunaliella Salina*) în vederea selectării unor microalge cu conținut ridicat în ulei și carotenoizi. La sfârșitul perioadei de creștere exponențială biomasa algală a fost centrifugată și liofilizată. Biomasa algală separată din mediul de cultură a fost procesată mai departe pentru obținerea fracției lipidice și a conținutului de carotenoizi. În *activitatea A1.1* s-a urmărit cultivarea, modelarea și optimizarea creșterii algelor și procesarea biomasei utilizând metode de extracție convenționale și neconvenționale. Aceasta activitate finalizându-se în etapa nr. 2. În vederea selectării tulpinilor algale s-au studiat 2 alge verzi și o alga roșie. Culturile au fost monitorizate timp de 30 de zile, în fiecare zi prelevându-se câte o probă analizată spectrofotometric la lungime de undă 680 nm, pentru măsurarea densității optice și determinarea curbei de creștere

În cadrul *Etapei nr. 2* Procesarea biomasei microalgale prin metode de extracție convenționale și neconvenționale s-a avut în vedere realizarea următoarelor activități: Finalizarea activității *A2.1*; Procesarea biomasei microalgale prin metode de extracție convenționale și neconvenționale (*Act 2.2*) și Studiarea activităților antioxidante ale compusilor extrasi (*Act 2.3*). În activitatea *2.1 Cultivarea, modelarea și optimizarea creșterii*

algelor și procesarea biomasei utilizand metode de extracție convenționale și neconvenționale s-a studiat optimiza parametrilor de creștere ai microalgei *Dunaliella salina* prin modificarea factorilor nutriționali, pentru a maximiza producția de antioxidanți și fracții lipidice. În acest scop, concentrațiile diferitelor săruri din mediul de creștere au fost variate. Biomasa obținută a fost analizată cantitativ și calitativ pentru a determina concentrația de biomasă și concentrația de compuși bioactivi în raport cu compoziția mediului de creștere. Pigmentii au fost extrași din biomasa microalgală uscată, cu solvenți polari. Frația lipidică a fost extrasă din biomasa uscată prin extracție Soxhlet convențională, iar profilul acizilor grași polinesaturați (PUFA) a fost determinat prin GC-MS. Au fost studiate efectele modificării compoziției mediului de creștere asupra productivității biomasei și acumulării de biocompuși în *Dunaliella salina*, tulpină disponibilă în colecția de la ICECHIM. Rezultatele obținute, indică efecte atât pozitive, cât și negative asupra creșterii și proliferării celulelor, în timp ce conținutul de lipide a fost în general mai mare decât proba. Factorii de stres din mediul de creștere au dus la o scădere atât a acumulării de pigment, cât și a producției de ficobiliproteine, mai ales când s-au redus cantitățile de sulfat de magneziu și clorură de calciu. Acest comportament este în concordanță cu tendința microalgelor de a acumula lipide în condiții limitate de nutrienți, spre deosebire de pigmenti. În cadrul acestei activități **2.2 - Procesarea biomasei microalgale prin metode de extracție convenționale și neconvenționale** s-a avut în vedere realizarea unui studiu comparativ privind extracția fracției lipidice (uleiul algal) din biomasa algală prin tehnici de extracție convenționale și neconvenționale. Extracția fracției lipidice și de pigmenti s-a testat utilizând tehnici de extracție convenționale (extracția Soxhlet) și neconvenționale (extracția cu ultrasunete). Rezultatele preliminare au indicat faptul ca extracția cu Soxhlet presupune consum de energie, timp mare de reacție și temperaturi ridicate ce pot conduce la deteriorarea termică a compușilor de interes. Din acest motiv experimentele s-au concentrat pe determinarea parametrilor optimi de extracție aplicând extracția asistată de ultrasunete (EAU), într-o singură etapă atât a fracției lipidice cât și a pigmentilor utilizând solvenți uzuali în industria alimentară (etanol, apă și hexan). Rezultatele experimentale au arătat că sistemul de solvenți cu un raport mai mare de solvent polara a condus la creșterea randamentului de extracție în conținutul total de carotenoizi de la 730,70 μg/g la 6435,60 μg/g. În ceea ce privește distribuția conținutului de carotenoid între faza etanolică apoasă și hexan, cel mai mare randament de 5762,08 μg/g carotenoid a fost obținut în faza de hexan. Același comportament a fost observat și pentru randamentul extracției lipidelor, valoarea maximă de 29,07 mg/g a fost înregistrată în raport de 1:4. Pentru determinarea activității de reducere a radicalilor liberi a unor extracte, s-a folosit în calitate de substrat, reactivul este 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Toate cele 3 probe au prezentat o dependență a activității oxidante cu concentrația, valoarea cea mai mare înregistrându-se la concentrația cea mai mare de 100 μg/ml. Activitatea oxidanta cea mai mare a prezentat-o exopolizaharidele (73,94%), în comparație cu biomasa microalgală *Chlorella vulgaris* (64,52 %) și *Porphyridium purpureum* (58,89%).

În cadrul **etapei nr. 3** intitulată **Procesarea compușilor de interes extrași din biomasa microalgala pentru a sintetiza produși cu valoarea adăugată** s-a urmarit obtinerea esterilor etilici ai acizilor grași polinesaturați (PUFAE) și a acidului levulinic din fracțiunea de carbohidrați urmata de conversia termică a biomasei în biochar. Astfel, în cadrul activității **3.1 Sinteza esterilor etilici ai acizilor polinesaturați (PUFA)** s-a studiat esterificarea acizilor grași liberi din uleiul de microalge cu etanol în prezența unor noi catalizatori acizi solizi. Optimizarea

parametrilor (raportul molar ulei:alcool, timpul de reacție, masa catalizatorului) au fost obținuți folosind proiectarea experimentală. Noii catalizatori solid-acizi eficienți obținuți au fost caracterizați folosind tehnici adecvate. Etapa de transesterificare a uleiului de alge pretratate cu etanol a fost realizată folosind un catalizator heterogen cu structură de hidrotalcit. În continuare în cadrul activității 3.2 **Sinteza acidului levulinic din fracția de carbohidrați**, s-a preparat un catalizator acid magnetic cu structură de superacid. Catalizatorul a fost sintetizat utilizând metoda co-precipitării urmată de impregnarea suportului cu o soluție de acid sulfuric concentrație 0,1M. Catalizatorul astfel preparat a fost caracterizat utilizând analiza de TGA, XRD și BET. Catalizatorul a fost testat în sinteza acidului levulinic din carbohidrați (fructoză). În activitatea 3.3 **Conversia termică a biomasei delipidizate în biocarbune**, biocărbunelul obținut ca materie humică în procesul de sinteză a acidului levulinic, a fost testat ca adsorbant pentru îndepărtarea nitraților din soluțiile apoase. Proprietățile fizico-chimice ale biocărbunelului au fost evaluate prin tehnicile: TGA, XRD, FT-IR și BET. Metoda suprafeței de răspuns bazată pe un design Box-Behnken (BBD) a fost utilizată pentru optimizarea procesului. Sinteza biocărbunelului magnetic (Fe₃O₄-BC) a fost realizată prin metoda co-precipitării. Metoda suprafeței de răspuns (RSM) bazată pe un design Box-Behnken (BBD) a fost folosită pentru optimizarea procesului. Diferiți parametri precum influența pH-ului, masei de adsorbant și timpul de contact au fost studiați pentru a atinge adsorpția maximă a nitraților. Influența variabilelor independente precum pH-ului, masa de adsorbant și timpul de contact asupra capacității de adsorbție a fost analizată printr-o matrice de design Box-Behnken (BBD), corespunzătoare unei serii de 29 de experimente cu 5 replici în centrul de experimente. Rezultatele analizei varianței (ANOVA) au arătat că modelul dezvoltat este în bună concordanță cu datele experimentale.

În urma realizării activităților specifice proiectului s-a realizat și actualizat periodic pagina web al acestuia: <https://icechim.ro/project/algaebioref-en/>.

Conform cererii de finanțare indicatorii de proiect au fost îndepliniți prin realizarea rapoartelor științifice aferente fiecărei etape și prin diseminarea rezultatelor publicând rezultatele cercetărilor în reviste de specialitate cotate ISI și prin participarea la conferințe internaționale.

Rezultatele estimate ale proiectului: 2 articole trimise spre publicare în reviste indexate ISI

Rezultatele realizate ale proiectului: 3 articole trimise spre publicare în reviste indexate ISI

1. Vintila, A.C.N; Vlaicu, A; Radu, E; Ciltea-Udrescu, M.; Enascuta, E.C; Banu, I., Oprescu, E.-E., Evaluation of ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from microalgae, Journal of Food Measurement and Characterization, 2022, 16, 2518–2526. IF:3,00.

2. “Does the ultrasonic field improve the extraction productivity compared to classical methods – Maceration and reflux distillation?”, autori: Oprescu, E.-E., Enascuta, C.-E., Radu, E., Ciltea-Udrescu, M., Lavric, V., publicata în jurnalul Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, 2022, 179, 109082, IF:4,26.

3. Oprescu, EE., Enascuta, E.C., Vasilievici, G. et al. Preparation of magnetic biochar for nitrate removal from aqueous solutions. Reac Kinet Mech Cat 135, 2629–2642 (2022), IF: 1,84.

Rezultatele estimate ale proiectului: 4 participari la conferinte internationale indexate Scopus/ISI.

Rezultatele realizate ale proiectului: 6 participari la conferinte internationale indexate Scopus/ISI.

1. Paulenco Anca, Vintila Alin Cristian Nicolae, Galan Ana-Maria, Vlaicu Alexandru, Ionut Banu, Effects of stress factors in the growth medium on bio-compounds production by porphyridium purpureum, 19th International Scientific GeoConference SGEM XXIth International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying, Geology and Mining, Ecology and Management – SGEM 2021.

2. Vlaicu Alexandru, Vintila Alin Cristian Nicolae, Radu Adrian, Enascuta Cristina Emanuela, Screening of antioxidant and pufa production in dunaliella salina by altering growth nutritional factors, 19th International Scientific GeoConference SGEXXIth International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying, Geology and Mining, Ecology and Management – SGEM 2021.

3. Vlaicu Alexandru, Ciltea-Udrescu Mihaela, Vintila Alin Cristian Nicolae, Psenovschi Grigore, Paulenco Anca, Galan Ana-Maria, Stability of bioactive extracts from porphyridium purpureum microalgae biomass under various stress factors, “Priorities of chemistry for a sustainable development”, PRIOCHEM XVII, 2021

4. Popa, C., Oprescu, E.-E., Popescu, M. Study of the Influence of Process Parameters on Biomass Gasification using UniSim Design Environment, 14th International Conference on Electronics, Computers and Artificial Intelligence, ECAI 2022.

5. Cristina-Emanuela Enascuta, Elena-Emilia Oprescu, Catalina Calin, Gabriel Vasilevici, Cristina Popa, Adsorption of nitrate on magnetic microalgal biochar, XXIIInd International Multidisciplinary Scientific GeoConference, Surveying, Geology and Mining, Ecology and Management – SGEM 2022.

6. Cristina-Emanuela Enascuta, Elena-Emilia Oprescu, Elena Radu, Raluca Somoghi, Constantin Neamtu, Vasile Lavric, Microencapsulated polyunsaturated fatty acids used as nutraceuticals, XXIIInd International Multidisciplinary Scientific GeoConference, Surveying, Geology and Mining, Ecology and Management – SGEM 2022.

Director de proiect
CS II, dr. chim. Oprescu Elena-Emilia

