

(19)



(10) **LT 2012 072 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **2012 072** (51) Int. Cl. (2014.01): **C12M 1/00**
B03C 1/00
- (22) Paraiškos padavimo data: **2012 08 13** **B03C 9/00**
C11B 1/10
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2014 02 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (71) Pareiškėjas:
UAB „UNERA“, M. Pretorijaus g. 7-1, LT-06227 Vilnius, LT
VILNIAUS UNIVERSITETAS, Universiteto g. 3, 01122 Vilnius, LT
- (72) Išradėjas:
Vida BENDIKIENĖ, LT
Olegas ROMAŠKEVIČIUS, LT
Vita KIRILIAUSKAITĖ, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Liudmila GERASIMOVIČ, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Dumblių ląstelių ardymo ir bioproduktų išskyrimo būdas ir sistema

(57) Referatas:

Išradimas skirtas atsinaujinančių šaltinių - dumblių biomasės ląstelių suardymui sukamojo indukuoto magnetinio lauko pagalba ir ląstelėje sukauptų bioproduktų, tokių kaip lipidai, baltymai, pigmentai ir vitaminai, išskyrimo iš suardytos biomasės sistemoms ir būdams. Išskirti bioproduktai gali būti panaudoti įvairiose šiuolaikinės biotechnologijos pramonės srityse, ypač biodegalų (bioetanolio, biodujų, biodyzelino) bioskalių plastikų, pašarų ir/arba jų priedų bei maisto papildų gamyboje, medicinoje ir farmacijos pramonėje.

DUMBLIŲ LAŠTELIŲ ARDYMO IR BIOPRODUKTŲ IŠSKYRIMO BŪDAS IR SISTEMA

5 Išradimo sritis

Išradimas priskirtinas atsinaujinančių šaltinių – dumblių laštelių - biomasės (su)ardymui sukamojo indukuoto magnetinio lauko pagalba ir laštelėje sukauptų bioproduktų, tokių kaip lipidai, baltymai, pigmentai ir vitaminai, išskyrimui iš suardytos biomasės sistemoms ir būdams. Išskirti bioproduktai gali būti panaudoti įvairiose šiuolaikinės biotechnologijos pramonės srityse, ypač biodegalų (bioetanolio, biodujų, biodyzelino), bioplastikų, ploviklių, bioprašų ir maisto papildų gamyboje, kosmetikos ir farmacijos pramonėje, kt.

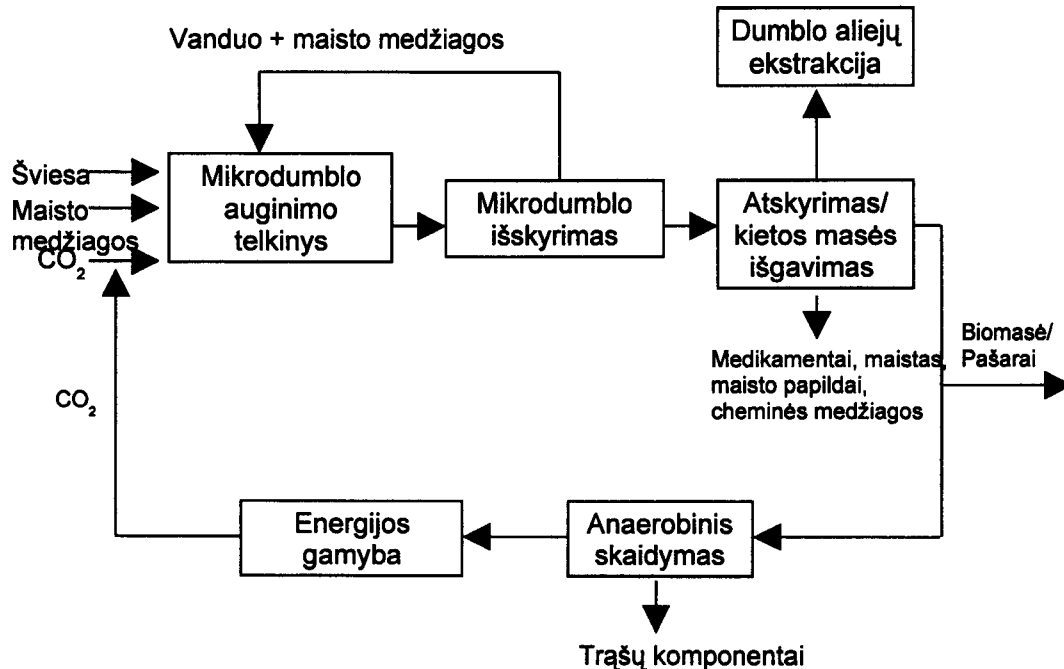
Technikos lygis

Pasaulyje dėl senkančių iškastinio kuro šaltinių, aplinkosauginių, augančio energijos poreikio ir kitų problemų pastaruoju metu yra ypatingai padidėjęs žaliavų (riebalų, baltymų, polisacharidų) poreikis įvairiose srityse, todėl intensyviai plečiama jų paieška. Remiantis Tarptautinės Energijos Agentūros prognozėmis, energijos poreikis pasaulyje iki 2030 m. turėtų išaugti 40%, o skysto biokuro sąnaudos išaugo trigubai vien 2000-2007 metų laikotarpyje. Komercinio biokuro rūšys (biodyzelinas, biodujos, bioetanolis, biovandenilis) apsprendžia ir jų gavimui būtinus žaliavos šaltinius bei atitinkamas technologijas. Tikslinės paskirties atsinaujinančiais žaliavų šaltiniais gali būti mikroorganizmų ir dumblių kaupiami produktai, tinkami naudoti įvairiose pramonės šakose (maisto, farmacijos, buitinės ir darniosios chemijos ir kt.) bei žemės ūkyje. Šiuo metu ypatingas dėmesys skiriamas būtent dumbliams - perspektyviems ir patraukliems tiek atsinaujinančios energijos, tiek maisto papildų ir/ar pašarų, tiek kitoms biotechnologijos pramonės šakoms svarbių produktų šaltiniams.

Vieni esminių dumblių pranašumų prieš analogiškas - iš aukštesniųjų augalų išskiriamų bioproduktų - technologijas yra tokie:

- efektyvios pigios saulės energijos sąnaudos (augalai sunaudoja 0,5% visos vidurio platumas pasiekiančios energijos, dumbliai - 10% šio kiekio);
- dumblių biomasės augimas greitas ir nepriklauso nuo oro sąlygų;
- ženkliai mažesni negu aliejingų grūdinių kultūrų užimamų dirbamos žemės plotai;
- ženkliai mažesnės negu drėkinamai žemdirbystei būtinos vandens sąnaudos;
- dumblių augimo terpių komponentai yra tik vanduo ir mineralinės druskos, o augimui sunaudojamas nieko nekainuojantis atmosferinis CO₂ (100 t mikrodumblių biomasės -183 t CO₂).

Apibendrinta galimų produktų iš dumblių gavimo fotosintezės keliu, perdirbant/įsisavinant CO₂, technologinio ciklo schema pateikta žemiau:



- 5 Pasaulyje didėjant žmonių populiacijai auga ir maisto poreikis, tačiau maistinėms kultūroms skiriami dirbamos žemės plotai yra riboti geografiškai, be to, jų plėtrai nėra galimybės ir dėl ekosistemos pažeidžiamumo, ir dėl aplinkosaugos reikalavimų griežtinimo. Todėl maisto trūkumo problemą pasaulyje bandoma spręsti keliais būdais, pvz., didinant žemės ūkio kultūrų derlingumą arba ieškant alternatyvių maisto produktų
- 10 šaltinių ir/ar efektyvių jų gavimo būdų [Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(6):635–48]. Šiuo metu ypač didelį susidomėjimą kelia dumbliai dėl jų biomasėje kaupiamų produktų įvairovės (1- 3 lentelės) ir galimybės panaudoti įvairiose srityse [Barrow, C., Shahidi, F. *Marine nutraceuticals and functional foods*. CRC Press, Taylor & Francis Group; 2008; Torrey, M. (2008). *Algae in the tank*. *Internat. News Fats, Oils and Related Mat.* 19(7):432–37;
- 15 Mata, T. M., A. A. Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. *Ren. Sustain. Energy Rev.* 14: 217–232]. Tai - neišnaudota ir daug potencialo turinti niša, kuri gali tiekti tokios pat ar net geresnės kokybės bioproduktus, kaip ir gaunamus iš įprastų šaltinių. Platų jų pritaikymą lemia tai,
- 20 kad skirtingos padermės dumblių biomasėje gausu lipidų (Renaud, S.M., Tinh, L.V., Parry, D.L. (1999). *The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture*. *Aquaculture*. 170:147–59; Pulz and Gross. 2004) baltymų, pigmentų, angliavandenių, vitaminų (1-2

lentelės žemiau), kurie labai efektyviai ir greitai didina kultivuojamų dumblių biomasės prieaugį, kas itin svarbu norint konkuruoti su tradiciniais bioproduktų šaltiniais.

1 lentelė

Kai kurių dumblių produkuojamų aliejų išeigos

Eil. Nr.	Dumbliai	Aliejaus išeigos (% nuo sauso svorio)
1.	<i>Ankistrodesmus TR-87</i>	28-40
2.	<i>Botryococcus braunii</i>	29-75
3.	<i>Chlorella sp.</i>	29
4.	<i>Chlorella protothecoides</i> (autotrophic/heterotrophic)	15-55
5.	<i>Cyclotella DI- 35</i>	42
6.	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	36-42
7.	<i>Hantzschia DI-160</i>	66
8.	<i>Nannochloris</i>	31(6-63)
9.	<i>Nannochloropsis</i>	46(31-68)
10.	<i>Nitzschia TR-114</i>	28-50
11.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	31
12.	<i>Scenedesmus TR-84</i>	45
13.	<i>Stichococcus</i>	33(9-59)
14.	<i>Tetraselmis suecica</i>	15-32
15.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	(21-31)
16.	<i>Crptheodinium cohnii</i>	20
17.	<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
18.	<i>Schiochytrium</i>	50-77

5

2 lentelė

Dumblių sausos biomasės cheminė sudėtis (%)

Dumblių kamienas	Baltymai	Angliavandeniai	Lipidai	Nukleorūgštys
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

10

3 lentelė

5 Dveiose dumblių padermėse esančių pagrindinių riebalų rūgščių sudėties (%) palyginimas

Riebalų rūgštys (RR)	<i>Cladophora fracta</i>	<i>Chlorella protothecoides</i>
Sočiosios RR	12-14	11-13
Nesočiosios RR	33-35	24-26
Polinesočiosios RR	51-53	63-65
Kitos RR	3-4	2-3

Po dumblių kultivavimo sukaupta biomasė, kaip atsinaujinantis šaltinis, randa platų ir nuolat didėjantį pritaikymą įvairiose srityse [Kijne J. W. Unlocking the Water Potential of Agriculture. Rome: FAO, 2003: 26; Brennan, L. and P. Owende. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Ren. Sustain. Energy Rev.* 14 (2): 557–577.]; biodegalai (bioetanolis, biodyzelinas, biovandenilis); maisto papildai (tabletės, kapsulės, milteliai, tirpalai) [Rasmussen R. S., Morrissey M. T., Steve L. T. Marine biotechnology for production of food ingredients. In: *Advances in Food and Nutrition Research*, 2007, pp. 237–292, Academic Press, Boston, Mass, USA, 2007]; kosmetikos priedai [Humphrey, A.M. 1980. Chlorophyll. *Food Chem.* 5 (1): 57–67]; kosmetikos priedai [Humphrey, A.M. 1980. Chlorophyll. *Food Chem.* 5 (1): 57–67]; natūralūs - bio-dažikliai; pašarai ir/ar jų papildai [Humphrey A. M. (2004). Chlorophyll as a color and functional ingredient. *J. Food Sci.* 69 (5): 422–425; Becker E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25(2): 207-10]; kokybiški natūralūs produktai: polinesočiosios riebalų rūgštys (angl. PUFA), ω -3 riebalų rūgštys, pigmentai, stabilūs izotopai [Spears K. 1988. Developments in food colourings: the natural alternatives. *Trends Biotechnol.* 6 (11): 283–288.].

25

Kadangi, kaip minėta, dumblių biomasėje kaupiami produktai yra viduląsteliniai, nustatyta, kad dumblių ląstelėse sukaupto pigmento – chlorofilo- ekstrakcija organiniais tirpikliais (klasikinis pigmentų išskyrimo būdas) ženkliai pagerėja po vieno iš šių papildomų būdų - ardymo malimo, homogenizavimo, ultragarsinio apdoravimo. Simon ir Helliwell [Simon D. and S. Helliwell. (1998). Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. *Water Research.* 32 (7): 2220–2223] nustatė, kad optimaliausiu ekstrakcijos metodu išskirama (gaunama) tik ketvirtis viso sukaupto dumblių ląstelėse pigmento kiekio.

30

Produktų, sukauptų dumblių ląstelėse, išskyrimas yra viena iš sunkiausių užduočių bei brangiausiai kainuojančių proceso dalių.

Taigi viena iš svarbiausių ir iki šiol pasauliniu mastu neišspręstų problemų yra sudėtingas dumblių biomasės ardymas. Dėl storos dumblių ląstelių sienelės viduląstelinų biologiškai aktyvių produktų išskyrimas tampa brangiausia ir limituojančia viso proceso dalimi.

Kadangi skirtingai nuo mikroorganizmų, kurie produkuojamas medžiagas išskiria į aplinką (ekstraląsteliniai produktai), dumblių bioproduktai yra sukaujami ląstelės viduje (viduląstelinės medžiagos) ir dėl ypatingai tvirtų dumblių ląstelių sienelių, kaip minėta, jų suardymas pasaulinėje praktikoje yra viena iš sunkiausiai sprendžiamų problemų.

Naudojami įvairūs klasikiniai dumblių ląstelių biomasės ardymo būdai:

4 lentelė

Mikrodumblių ląstelių klasikiniai ardymo būdai ir priemonės*

Mechaninis poveikis	Nemechaninis poveikis
Ląstelių homogenizavimas	Užšaldymas
Malimas, trynimas su abrazyvinėmis medžiagomis	Organiniai tirpikliai (ekstrakcija)
Ultragarsu	Osmotinis šokas
Autoklavavimas	Rūgštinės ir šarminės reakcijos
Džiovinimas purkštuvinėse džiovyklose	Fermentinės reakcijos

* pagal ., Yoo, C., Lee, J.Y Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M. (2010). *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae*. *Bioresour Technol. Suppl 1*:S75-7.

Kaip jau minėta, tam tikslui yra naudojama daug žinomų, klasikinių ir nuolatos atnaujinamų metodų <http://www.oilgae.com/algae/oil/extract.html>.

Atitinkamai nemažai dumblių ardymo būdų ir priemonių yra atskleista patentuotuose techniniuose sprendimuose: pavyzdžiui, akustinis ardymas (WO2010/132414, US4065875, US2010/0261918, US2012/0095245, WO2011/069070, kt.); malimas-trynimas (UA24468U; kt.) fermentinė hidrolizė ir pan. (SU662046 ir kt.) Be klasikinių mechaninių ar nemechaninių ląstelių ardymo metodų yra naudojama ir ekstrakcija organiniais tirpikliais, pvz., patentinė paraiška US 2012/0095245 A1, kt., <https://www.cyberlipid.org/extract/extr0001.html>.

Tačiau jie visi turi vienokių ar kitokių trūkumų. Pvz., mechaniniai yra, nepatogūs, ilgai trunkantys, sunkiai pritaikomi gamyboje didele apimtimi ir mažai veiksmingi. Fizikiniai reikalauja daug energijos, brangūs; fermentiniai - efektyvūs, bet kolkas yra ypatingai brangūs.

Yra žinomi dumblių ląstelių ardymo būdai, panaudojant elektros lauko poveikį, pavyzdžiui, WO2010/123903; WO2012/021831, kt. Tarptautinėje paraiškoje WO2012/010969 aprašytas dumblių ląstelių ardymas elektroporacijos būdu pulsuojančio elektromagnetinio 0,5-500 kV/cm lauko poveikyje.

5

Siūlomam išradimui artimiausiu sprendimu gali būti laikoma tarptautinėje paraiškoje WO2011/109161 atskleista sistema, apimanti bent vieną dumblių ląstelę, metalo nanodaleles ir elektromagnetinės spinduliuotės generatorių, generuojantį mikrobangų spinduliuotės didelės galios linijinį lauką. Tačiau praktinis tokių ląstelių ardymo priemonių biotechnologinis pritaikymas abejotinas, nes pagal aprašyme pateiktus fizikinius parametrus:

- atsiranda labai didelės energijos sąnaudos;
- dėl naudojamo aukšto (0,3-300 GHz) mikrobangų dažnio ir neapibrėžtos darbinės zonos kyla pavojus aptarnaujančio personalo sveikatai ir/arba apsaugos nuo tokio poveikio būtinybė, kas sudaro papildomas sąnaudas ir pan.;
- sudėtinga įranga.

15

Efektyvaus laiko ir energijos sąnaudų prasme, lengvai pritaikomo gamyboje dumblių ląstelių suardymo būdų ir sistemų paieška yra labai svarbi viduląstelinių dumblių bioproduktų išlaisvinimui su tolesniu jų išskyrimu iš suardytos ląstelių biomasės ir praktiniu jų panaudojimu.

20

Išradimo esmė

Dumblių ląstelių ardymo ir bioproduktų išskyrimo iš jų būdas pagal šį išradimą apima dumblių biomasės auginimą, koncentravimą, dumblių ląstelių apdorojimą elektromagnetinio lauko poveikiu ir tikslinių bioproduktų iš dumblių ląstelių išlaisvinimą ir ekstrahavimą. Būdas skiriasi tuo, kad į užaugintų dumblių biomasės koncentratą prideda feromagnetinių dalelių arba nanodalelių ir ne ilgiau kaip 1 min. apdoroja kintamo sukamojo magnetinio lauko poveikiu, kurio magnetinio srauto tankis apdoravimo zonos centre yra 0,08-1 T.

30

Kintamo sukamojo magnetinio lauko dažnis pagal išradimą yra 50-400 Hz; sukamojo magnetinio lauko linijinis greitis yra 0,1-240 m/s.

Užaugintus dumblius koncentruoja pašalinant iš biomasės bent dalį vandens, optimaliai centrifuguojant, ir/arba po dumblių biomasės nucentrifugavimo pakeičiant terpę tikslinio bioproducto išskyrimui tinkamu tirpalu ir/arba tirpikliu, įskaitant distiliuotą vandenį.

- 5 Dumblių padermės apima *Scenedesmus dimorphus*, *Nannochloropsis*, *Nannochloris*, *Spirulina platensis*, *Botryococcus braunii*, ir *Botryococcus braunii* CCALA 220, *Chlorella* padermės *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris* CCALA 269, *Chlorella vulgaris* 896, *C. cf. vulgaris* ir/arba genetiškai modifikuotus variantus, tiek monokultūros formoje, tiek ir skirtingų dumblių padermių mišinio formoje.
- 10 Bioproductas pagal išradimą apima bet kurią iš dumblių ląstelėse sukauptų naudingų bioproductų, tokių kaip lipidai, baltymai, pigmentai, vitaminai. Tikslinį bioproductą iš suardytų dumblių ląstelių biomasės ekstrahuoja konkrečiam bioproductui įprastais būdais.
- 15 Kitas išradimo objektas yra bioproductais praturtinta terpė po dumblių ląstelių suardymo išradimo siūlomą būdu, kuri skirta konkrečių bioproductų, tokių kaip lipidai, baltymai, pigmentai, vitaminai, išskyrimui ir ekstrahavimui.
- 20 Dar vienas išradimo objektas - dumblių ląstelių ardymo ir bioproductų išskyrimo iš jų sistema, apimanti ardymui ir bioproductų išskyrimui skirtą dumblių ląstelių kiekį, feromagnetines daleles arba nanodaleles, kurių santykis su minėtu dumblių ląstelių kiekiu sudaro apytikriai 10-7:1, ir elektromagnetinę malyklę, skirtą apdoroti minėtą dumblių ląstelių kiekį kintamo sukamojo magnetinio lauko poveikiu pagal išradimą.
- 25 Minėta elektromagnetinė malyklė yra įrenginys, apimantis darbo bloką su aktyviaja zona, kur darbo blokas apgaubia kintamo sukamojo magnetinio lauko induktorių, kuriantį magnetinį lauką darbo bloko aktyvioje zonoje; induktoriaus žadinimo srovės galios reguliatorių; induktoriaus ir darbo bloko aušinimo mazgą; kur prie kiekvienos induktoriaus žadinimo ričių grupės yra nuosekliai prijungtas bent vienas kondensatorių grupės kondensatorius. Elektromagnetinės malyklės visų kondensatorių grupės kondensatorių parametrai parenkami taip, kad visose magnetinio lauko žadinimo fazinėse grandinėse būtų tenkinamos įtampų rezonanso sąlygos.
- 30
- 35 Išradimas yra aprašytas žemiau su detalėmis ir lydinčiais brėžiniais bei pavyzdžiais.

Detalus išradimo aprašymas

Dumblių ląstelių ardymas ir bioproduktų išskyrimas buvo vykdomi pagal žemiau pateiktą bendrą metodinę schemą:

I stadija:

Dumblių ląstelių auginimas (kultivavimas) – biomasės gavimas ir paruošimas
ląstelių suardymui

5



II stadija

Paruoštos biomasės ląstelių ardymas kintamo sukamojo magnetinio lauko poveikiu
ir bioproduktų išlaisvinimas



III stadija

Konkrečių bioproduktų (tokių kaip lipidai, baltymai, pigmentai, vitaminai, kt.)
išskyrimas iš lizuotos dumblių biomasės

10

Pirmoje stadijoje dumbliai kultivuojami įprastais būdais optimizuotose terpėse ir sąlygomis, leidžiančiomis sukaupti pakankamą tikslinių bioproduktų kiekį. Dumblių ląstelės gali būti bet kokios padermės (gėlavandeniai, jūriniai; žaliadumbliai, melsvadumbliai; mikro- ir makrodumbliai; genetiškai modifikuoti dumbliai, turintys rekombinantinių genų), tinkamos kultivuoti tiksliniams bioproduktams gauti. Dumblių padermės, tarp kitų, gali apimti *Schiochytrium*, *Neochloris oleoabundans*, *Cryptocodinium cohnii*, *Thalassiosira pseudonana*, *Tetraselmis suecica*, *Stichococcus*, *Scenedesmus TR-84*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Nitzschia TR*, *Nannochloropsis*, *Nannochloris*, *Hantzschia DI*, *Dunaliella tertiolecta*, *Cyclotella DI*, *Ankistrodesmus TR-87*, *Botryococcus braunii*, *Pleurochrysis carterae* (CCMP647); *Dunaliella* kamienas, pavyzdžiui *Dunaliella salina* arba *Dunaliella tertiolecta*; *Chlorella* padermės *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp. 29*, arba *Chlorella protothecoides*, *Gracilaria*, *Sargassum* ir/arba genetiškai modifikuotus jų variantus. Gali būti vienos dumblių padermės monokultūra arba gali būti daugiau nei viena dumblių padermė.

20

Dumblių biomasė koncentruojama, pašalinant arba nepašalinant (ardoma betarpiškai biomasės terpėje) dalį vandens ir/arba po biomasės nucestrifugavimo pakeičiant terpę tolimesniam bioproducto išskyrimui distiliuotu vandeniu arba tinkamu bioproducto išskyrimui tirpalu ir/arba tirpikliu.

- 5 Dumblių ląstelių suardymui naudoja apdorojimą kintamu sukamuoju indukuotu magnetiniu lauku, elektromagnetinėje malyklėje, kur lokalinių elektromagnetinių laukų ir jų lydimų reiškinų superpozicijos visuminis poveikis lemia greitą dumblių ląstelių sienelių suardymą ir leidžia veiksmingai išskirti tikslius ląstelėje sukauptus bioproductus (lipidus, baltymus, pigmentus, vitaminus ir kt.) iš suardytos dumblių biomasės, naudojant mažas energijos ir
10 laiko sąnaudas.

Apdorojimą sukamuoju magnetiniu lauku vykdo tam skirtoje elektromagnetinėje malyklėje, pavyzdžiui, procesų aktyvinimo įrenginyje pagal Liuksemburgo patentinę paraišką Nr.91865 („Process activating unit“, padavimo data 2011-09-05), kuri paraiška laikytina įtraukta pagal nuorodą. Toks įrenginys (Fig. 1) apima galios reguliatorių, kurio
15 įėjimai prijungti prie elektros tinklo, o išėjimai – prie papildomos reguliuojamos talpos elektrinių kondensatorių grupės įėjimų; šios kondensatorių grupės išėjimai prijungti prie sukamojo magnetinio lauko induktoriaus, kartu su aušinimo mazgu sudarančio bendrą konstrukcinį vienetą. Minėtas magnetinio lauko induktorių apgaubia darbo bloką, turintį, pavyzdžiui, cilindro formą. Prie kiekvienos minėto induktoriaus žadinimo ričių grupės
20 nuosekliai prijungtas vienas papildomos kondensatorių grupės kondensatorius. Visų kondensatorių grupės kondensatorių parametrai parenkami taip, kad visose magnetinio lauko žadinimo fazinėse grandinėse būtų tenkinamos įtampų rezonanso sąlygos, siekiant maksimaliai padidinti sunaudojamos elektros energijos galios koeficientą ir tuo pačiu minimizuoti iš elektros tinklo paimamos energijos sąnaudas. Aktyvinimas vyksta,
25 padavus įtampą per galios reguliatorių ir kondensatorių grupę į magnetinio lauko induktorių; prieš tai galios reguliatoriuje nustatoma konkretų aktyvinimo procesą atitinkanti magnetinio lauko žadinimo galia.

Koncentruotą dumblių suspensiją iš pirmos stadijos, pridėjus 1-15 mm ilgio pailgos formos feromagnetinių dalelių arba nanodalelių santykiu 10:1, talpina į 5-360 ml uždara
30 konteinerį, pavyzdžiui, tuščiaidurį nepermatomą nemagnetinės medžiagos cilindrą, kuris įtaisomas minėtos elektromagnetinės malyklės darbo bloko aktyvioje zonoje. Konteinerio turinys ne daugiau kaip 1 min. aplinkos temperatūroje veikiamas induktoriaus sukuriama kintamo (50-400 Hz) dažnio sukamojo magnetinio lauko, kur magnetinio srauto tankis induktoriaus centre yra nuo 0,08 iki 1 T; sukamojo magnetinio lauko linijinis

greitis 25 m/s. Esant dažniui 50 Hz feromagnetinių dalelių sukurinio slukšnio tūrio vienetė pasiekiamas 10 000 kW/m³ eilės galingumas W_k . Sukurtų papildomų laukų amplitudė - nuo 0,5 iki 18 mV ir dažnis nuo 10 iki 700 Hz.

Po dumblių ląstelių sienelių suardymo gaunama lizuota biomasė pasižymi tuo, kad yra linkusi išsisluksniuoti; todėl palengvėja atskyrimo procesas ir kai kuriais atvejais netgi pakanka dekantacijos. Lizuota biomasė arba užšaldoma -18°C šaldymo kameroje (šaldytuve), arba iš karto panaudojama tolimesniam atitinkamo tikslineo bioproducto arba kelių tikslineų bioproductų išskyrimui. Žinomi metodai, tokie kaip centrifugavimas, išsodinimas, ekstrakcija ar šių metodų kombinacija ar kiti metodai gali būti panaudoti bioproductų iš/atskyrimui nuo liekamosios (lizuotos) biomasės.

Po (su)ardymo bioproductai, pvz., lipidai (gali būti laisvi aliejai) per suardytas dumblių sieneles išlaisvinami į aplinką. Lipidų cheminė sudėtis gali būti skirtinga ir priklauso nuo naudojamų dumblių padermės. Lipidai dumblių ląstelėse kaupiami viduląstelinėse vakuolėse - riebalų kaupimo „kamerose“. Po ląstelių sienelių (su)ardymo riebalai gali būti atpalaiduoti laisvoje formoje, bet gali likti riebalų kaupimo „kamerose“ – vakuolėse. (Su)ardymo proceso režimas turi įtakos ir lemia ląstelių sienelių suardymo laipsnį ir bioproductų atpalaidavimo pilnumą.

Visi tirtų padermių dumblių ląstelių viduje sukaupti bioproductai (lipidai, baltymai, pigmentai ir vitaminai) po ląstelių lizavimo siūlomu būdu be cheminės sandaros pažeidimų pilnai išlaisvinami/atpalaiduojami iš viduląstelineų struktūrų; ženkliai lengviau (dėl agregacijos ir išsisluksniavimo) ir mažesnėmis laiko ir energijos sąnaudomis tradiciniais, klasikiniais kiekvienai bioproducto klasei metodais gali būti atskiriami nuo likutinės masės; išskiriami gryname pavidale ir praktiškai panaudojami pagal tikslą ir poreikį.

Bioproductai, gauti pagal siūlomą išradimą, toliau gali būti panaudoti konkrečioms biotechnologinės pramonės produktams gauti. Pvz., riebalai (triacilgliceroliai) su įvairiais alkoholiais gali būti transesterinami iki riebalų rūgščių alkilo esterių. Jei reakcijoje bus naudojamas metilo alkoholis, bus gaunami riebalų rūgščių (RR) metilo esteriai (biodyzelinas), jei aukštesnieji, ilgagrاندžiai, šakotos cheminės sandaros alkoholiai – atitinkami RR esteriai, naudojami darniosios chemijos, farmacijos ir kt. pramonės šakose. Be to, iš dumblių lipidų gali būti gautas biobutanolis, įvairios sudėties išgryninti augaliniai aliejai, polinesočiosios γ -, ω - riebalų rūgštys ir t.t.

Feromagnetinės dalelės arba nanodalelės gali būti pašalintos bet kuriuo būdu, pvz., magnetinio lauko poveikiu, centrifugavimu. (Su)ardymo procese gali būti pastoviai panaudotos pakartotinai regeneruotos feromagnetinės dalelės. Likutinė biomasė po minėtų bioproduktų išskyrimo gali būti panaudota kaip atsinaujinantis biokuro (biodujų, metano) šaltinis, kaip pašarų priedai. Likutinė terpė, vandens nuotekos gali būti gražinta į procesą dumblių rekultivavimui.

Trumpas figūrų aprašymas:

Fig. 1 pavaizduotas įrenginys (blokinė schema, žinomas technikos lygis), tinkamas elektromagnetinės malyklės funkcijai atlikti ir sukamojo magnetinio lauko poveikiui pagal išradimą sukurti: 1- galios reguliatorius; 2- reguliuojamos talpos kondensatorių grupė; 3- magnetinio lauko induktorius; 4 – darbo blokas.

Fig. 2. Grynų cheminių junginių, kaip galimų dumblių lipidinės kilmės bioproduktų, chromatografinis vaizdas (kontrolės). 1- oleino rūgšties metilo esteris (MetO, metiloleatas); 2 – trioleinas (TO; TAG – triacilglicerolis); 3 - oleino rūgštis (OR, riebalų rūgštis (RR)); 4 – 1,3, 1,2 – dioleinių mišinys (DO; DAG – diacilgliceroliai); 5 – monooleinas (MO, MAG – mono acilglicerolis). Sistema: petrolio eteris (PE): dietilo eteris (E) : acto rūgštis (AR) - (85:15:2).

Fig. 3 (A, B) pateiktos dumblių *Chlorella vulgaris* ląstelių iki (su)ardymo ir po (su)ardymo mikroskopinio vaizdo nuotraukos: A - *Chlorella vulgaris* CCALA 269 ląstelių mikroskopinio vaizdo nuotrauka (padidinimas 40x); B - elektromagnetine malykle lizuotų *Chlorella vulgaris* CCALA 269 ląstelių mikroskopinio vaizdo nuotrauka (padidinimas 100x).

Fig. 4 Pigmentų koncentracijos pasiskirstymo chromatografinis vaizdas. 1, 2 ir 3-iame takelyje užnesti ekstraktai atitinkamai iš *C.vulgaris* 269, *C.vulgaris* 896 ir *C.cf.vulgaris* suardytos biomasės. S- starto linija, F- fronto linija.

Fig. 5. *Chlorella vulgaris* lizuotos biomasės išekstrahuotų lipidinės kilmės bioproduktų chromatografinis vaizdas: TAG, DAG, MAG – tri-, di- ir mono-acilgliceroliai, RR riebalų rūgštys (pažymėjimai, kaip antroje figūroje).

Išradimo pavyzdžiai

Toliau pateikiami konkretūs dumblių ląstelių suardymo ir bioproduktų išskyrimo pavyzdžiai tik iliustruoja išradimo įgyvendinimą, bet neapriboja jo apimties.

1 pavyzdys. ***Botryococcus braunii* ir *Scenedesmus dimorphus* dumblių ląstelių ardymas ir lipidų išskyrimas**

Atskirti *Botryococcus braunii* ir *Scenedesmus dimorphus* ląstelių biomasę nuo auginimo terpės galima filtruojant arba centrifuguojant terpę, o lipidus išskirti klasikiniiais metodais.

- 5 *B. braunii* ląstelės turi labai storą sienelę ir šlapioje biomasėje yra 10 kartų daugiau vandens, nei lipidų. *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii* ir/ar *Scenedesmus dimorphus* dumbliai buvo auginami Bristol maitinimo terpėje, $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C temperatūroje, natūraliu dienos/nakties apšvietimo režimu.

- Standartinis metodas: Padermė auginama skystoje terpėje. Iš mėgintuvėlių su agarizuota
10 terpe sėjimo lazdele padermė perkeliama į mėgintuvėlius su 50 ml skystos terpės. Auginama 30 dienų autoklavuotoje (120° C 1 MPa 30 min.) modifikuotoje Bristol terpėje. Po 30 dienų auginimo, kai vizualiai matyti, kad biomasės susiformavo pakankamai, 15 ml (10 % terpės tūrio) kultūros persėjama į 250 tūrio kolbą, kurioje yra 150 ml autoklavuotos, modifikuotos Bristol terpės. Steriliai užsėjus kultūrą kolba užkemšama
15 vatos kamščiu. Padermių persėjimas į skystą terpę atliekamas kas 10 – 20 dienų, atsižvelgiant į biomasės augimo greitį ir ląstelių koncentraciją.

Kultivuojama auginimo spintoje 25° C temperatūros ir 12:12 (12val šviesos:12 val. tamsos) šviesos arba dienos/ nakties periodo sąlygomis 7- 14 dienų.

Dumblių biomasės koncentracijos nustatymui naudojami optinio tankio matavimai.

- 20 Užsėjus padermes yra išmatuojami užsėtų terpių optiniai tankiai. Optiniam tankiui matuoti pasirinktas bangos ilgis yra D 670 (pagal ALGALTOXKIT FTM metodiką). Optinio tankio matavimai kartojami tris kartus ir skaičiuojamas vidurkis. Optinis tankis matuojamas kasdien 14 dienų bėgyje.

- Dumblių biomasė standartiniu metodu sukonzentruojama 7 ir 14 auginimo dienomis
25 naudojant centrifugą. Į 10 - 250 ml tūrio centrifuginius mėgintuvėlius pilama skysta terpė su paderme ir centrifuguojama 1500 rpm 15 min. Tada centrifugatas surenkamas ir supilamas į atskirus mėgintuvėlius, o surinkta biomasė praplaunama distiliuotu vandeniu ir dar kartą centrifuguojama tokiomis pačiomis sąlygomis. Surinkta šlapia biomasė užšaldoma (-18° C) tolimesniems tyrimams.

- 30 Lipidų ekstrakcija organiniais tirpikliais:

Ependorfiniame mėgintuvėlyje į šlapią dumblių 0,45 g biomasę pridedama 0,16 g stiklo grūdelių ir visas turinys užpilamas 1 ml tirpikliu, kurio sudėtis chloroformas:metanolis (CHCl₃:CH₃OH) tūrių santykiu 3:1, ir dedama 30 minučių į purtyklę (1400 rpm). Purtyklėje mėginiai išlaikomi 20 val. Išėmus iš purtyklės mėginiai nucentrifuguojami

- 35 rpm 5 min. Išsiskyres vanduo virš mėginių ependorfiniuose mėgintuvėliuose

nusiurbiamas automatine pipete. Imami tiriamieji mėginiai iš chloroforminio sluoksnio po atsisluoksniavusiu dumblių biomasės sluoksniu ependorfiniame mėgintuvėlyje ir analizuojami.

- Analizei plonasluoksnės chromatografijos (TLC) metodu naudotos stiklo plokštelės padengtos silikageliu (G-25, sluoksnio storis 0,25 mm). Parinkta tirpiklių sistema: 96:4:1 chloroformas–acetonas–acto rūgštis. Ant chromatografinės plokštelės 1,0 cm nuotoliu nuo krašto pažymima starto linija. Ant jos 0,8–1,0 cm nuotoliu vienas nuo kito automatine pipete užlašinami po 4–8 μl tiriamos medžiagos. Palaukiama kol dėmės išdžiūsta. Chromatografinė plokštelė dedama į chromatografijos indą su atitinkama tirpiklių sistema.
- 5 Naudotos tirpiklių sistemos: 80:20:2 petrolio eteris–eteris–acto rūgštis (pagrindinė), 70:30:2 petrolio eteris–eteris–acto rūgštis, toluolas–chloroformas 70:30, 96:4:1 chloroformas–acetonas–acto rūgštis. Išdžiovintos plokštelės ryškinamos jodo garų kameroje. Dėmių padėtis lyginama su standartu – atitinkamos koncentracijos grynų riebalų rūgščių, linalolo, linalolo acetato. Plokštelių tinkamumas ir elucijos sistemų
- 10 efektyvumas tolimesniam darbui pasirinktas, atsižvelgiant į gautus rezultatus (medžiagų atskyrimo efektyvumas, dėmių stabilumas ant plokštelių saugojimo metu ir kt.). Plokštelė išimama, pažymima fronto linija ir išdžiovinama traukos spintoje. Plokštelės ryškinamos jodo garų kameroje.
- Dėmių padėtis lyginama su atitinkamos koncentracijos kontrolėmis pvz., trioleinas, tripalmitinas; cis-13–dokazeno (C22:1, eruko) rūgštis; cis-9–oktadeceno (C18:1, oleino) rūgštis; trilaurino; 1,3–dipalmitoil-3–oleil–glicerolis; trikaprinas ir /ar kt.
- Naudojant fotodensitometrą (*Uvitec Cambrige Fire-reader imaging system*) apskaičiuojama ant plonasluoksnės chromatografinės plokštelės pasiskirsčiusių riebalų koncentracija.

25

Riebalų koncentracija šlapioje dumblių biomasėje apskaičiuota pagal formulę:

$$X = A \cdot B/C ,$$

- (čia X – riebalų koncentracija (mg/μl), A – nežinomos riebalų koncentracijos, dėmės parametrai (px), B – kontrolės koncentracija (1,3–dipalmitoil-3–oleil–glicerolis 0,098 mg/μl),
- 30 C - kontrolinės dėmės parametrai (5718014 px).

- Iš biomasės mėginio pašalinus vandenį centrifugavimu gauta apie 10 ml dumblių koncentrato. Jis supilamas į užsukamą cilindrinį konteinerį, pridodant feromagnetinių dalelių santykiu 10:1. Konteineris talpinamas elektromagnetinės malyklės (aprašytos
- 35 aukščiau) darbo bloko aktyvioje zonoje, kur 40 sek taiko 50 Hz sukamąjį magnetinį lauką, kurio magnetinio srauto tankis aktyviosios zonos centre 0,17 T. Apdorotas

dumblių koncentratas yra linkęs agreguotis, ko pasėkoje išsisluoksniuoja. Lipidai išskiriami įprastu būdu, ekstrahuojant heksanu; terpė gražinama į dumblių auginimo stadiją. Alternatyviai tinkamas organinis tirpiklis gali būti taip pat pridamas kartu su feromagnetinėmis dalelėmis prieš taikant apdorojimą sukamuoju magnetiniu lauku.

- 5 Likusi biomasė gali būti toliau panaudota kitų naudingų bioproduktų gavimui arba biodujų gamybai.

- Analogiškai pagal šio pavyzdžio metodiką galima išskirti lipidinės kilmės bioproduktus iš kitų padermių, pavyzdžiui, *Chlorella vulgaris* dumblių. Grynų cheminių junginių, kaip galimų dumblių lipidinės kilmės bioproduktų, chromatografinis vaizdas (kontrolės) pateiktas Fig. 2, kur 1- oleino rūgšties metilo esteris (MetO, metiloleatas); 2 – trioleinas (TO; TAG – triacilglicerolis); 3 - oleino rūgštis (OR, riebalų rūgštis (RR)); 4 – 1,3, 1,2 – dioleinų mišinys (DO; DAG – diacilgliceroliai); 5 – monooleinas (MO, MAG – mono acilglicerolis). Sistema: petrolio eteris (PE): dietilo eteris (E) : acto rūgštis (AR) - (85:15:2).
- 10

15 **2 pavyzdys. *Spirulina platensis* dumblių ląstelių ardymas ir baltymų išskyrimas**

- Spirulina platensis* dumbliai buvo kultivuoti standartinėmis sąlygomis maitinimo terpėje, natūraliu dienos/nakties apšvietimo režimu $25^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C temperatūroje (*Spirulina platensis* 1) ir standartinėmis sąlygomis maitinimo terpėje, natūraliu dienos/nakties apšvietimo režimu, bet $20^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C temperatūroje (*Spirulina platensis* 2). (*Spirulina platensis* biomasės) pavyzdžiai 1 ir 2 buvo gauti iš UAB „Splita“
- 20

- Žinomi dumblių ląstelėse esančių baltymų nustatymo būdai po ląstelių ardymo analoge (Meijer E.A. and R.H. Wijffels, 1998. Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae. Biotechnology Techniques, Vol 12, pp. 353-358) aprašytais metodais 1) lizės buferis (5 ml/l Tritono X-100, 0.3722 g/EDTA, 0.0348 g/ p- metilsulfonilfluorido, PMSF) 1 val.; 2) didelės galios ultragarsinė vonelė (Ultrasons, J.P. Selecta, Barcelona, Spain), trukmė - 10 min su lizės buferiu; 3) 5 min trynimasis grūstūvėliu piestoje su lizės buferiu; 4) 5 min trynimasis grūstūvėliu piestoje su lizės buferiu ir su aliuminio oksido milteliais (biomasės ir miltelių santykis 1:1). Baltymų kiekis buvo nustatomas Louri metodu), 5) Kjeldalio metodu buvo nustatytas bendras azoto ir elementinės analizės metodu - visas azoto kiekis mėginyje. Siūlomo metodo efektyvumo išryškiniui *Spirulina platensis* 1 ir *Spirulina platensis* 2 biomasė buvo ardyta tiek žinomais analoguose aprašytais, tiek ir išradime siūlomu būdais:
- 25
- 30

- 1) Suspendavimas lizės buferyje, 1 val.
 - 2) Trynimas grūstuvėliu piestoje su stiklo rutuliukais: 5 min (0,5 g drėgnos biomasės - 0,1 g stiklo rutuliukų, svorio santykis - 5:1) ir suspendavimas lizės buferyje arba dist. H₂O.
 - 3) Ardymas ultragarsu: 10 min, 175 W galia, lizės buferyje arba dist. H₂O (mėginys
- 5 laikomas ledo vonioje).
- 4) (Su)ardymas išradime siūlomu metodu su elektomagnetine malykle: - 1-5 g drėgnos biomasės suspenduota 3-15 mL dist. H₂O, malama su smulkiomis (1-10 mm) dalelėmis 45 s ir 60 s, ir su stambiomis (5-30 mm) dalelėmis 45 s ir 60 s.
- Baltymų kiekis nustatytas Louri (Lowry) metodu. Ardymas lizės buferiu pasirodė
- 10 neefektyviausias biomasės suardymo būdas, nes nustatytų baltymų kiekis yra tik ~3,85 %. Ardymu trinant piestoje su stiklo rutuliukais nustatyta, kad *Spirulina 1* biomasėje yra 41,34 % , o *Spirulina 2* biomasėje - 36,41 %. Labai panašios baltymų išeigos gautos suvidurkinus Lowry ir Smith'o metodais gautus duomenis iš ardytų ultragarsu mėginių - 71,76 % ir 70,84 % atitinkamai. Bretford'o metodas netinka
- 15 baltymų kiekiui nustatyti bet kuriuo būdu suardytoje *Spirulina* biomasėje, nes sumažina jų kiekį, lyginant su Smith'o ir Lowry metodais. Išdžiovintą *Spirulina 2* biomasę suardžius ultragarsu, baltymai buvo išsodinti trichloracto rūgštimi (TCA) ir jų koncentracija nustatyta anksčiau naudotais metodais. TCA išsodintų baltymų kiekio išeigos yra 65,76 ir 65,58 % atitinkamai, nustatytos Lowry ir Bretford'o metodais. Baltymų išeigos ardytoje ultragarsu,
- 20 bet TCA neišsodintoje biomasėje, nustatytos Lowry ir Smith'o metodais, buvo 71,76 % ir 70,84 % atitinkamai. Gaunamą ~5 % skirtumą, lyginant baltymų išeigą ardytoje ultragarsu ir TCA neišsodintoje biomasėje, galėjo lemti tai, kad TCA gali nepilnai išsodinti baltymus, esančius mėginyje, trumpus peptidus ir/ar laisvas aminorūgštis, bet kurie nustatomi ir Lowry, ir Smith'o metodais. Baltymų kiekis TCA išsodintame mėginyje, nustatytas
- 25 Bretford'o metodu, yra didesnis nei ultragarsu ardytame mėginyje, dėl galimo pašalinio įvairių ultragarsu ardytoje biomasėje esančių komponentų pašalinimo išsodinant TCA. *Spirulina* baltymų koncentracijai nustatyti klasikiniiais metodais suardytoje šlapioje biomasėje tinka ir Smith'o ir Lowry metodai, o išdžiovintoje – Lowry ir Bretfordo metodai.
- 30 (Su)ardžius išradime siūlomu būdu elektromagnetinėje malyklėje, baltymų kiekis buvo nustatytas visais trimis metodais – Lowry, Smith'o ir Bretford'o. Didžiausia baltymų koncentracija *Spirulina platensis 1* ir *2* biomasėje ir šiuo atveju nustatyta Lowry metodu - 87,76 % ir 82,77 % atitinkamai. Dalelių dydis turi įtakos proceso efektyvumui: su smulkiomis dalelėmis (1-10 mm) aptinkama daugiau baltymų, negu veikiant su
- 35 stambiomis dalelėmis, bet neturi reikšmės poveikio trukmė - po 45 s ir 60 s nustatytas baltymo kiekis praktiškai nesiskiria. Su stambiomis dalelėmis (5-30 mm) poveikio trukmės

ilginimas nuo 45 s iki 60 s turi įtakos proceso efektyvumui, nes Bretford'o metodu aptinkama ~ 18 %, Smith'o metodu ~ 19 % ir Lowry metodu ~ 23 % daugiau baltymų, negu po 45 s, tačiau nepasiekiamas baltymų kiekio lygis, kaip po poveikio 45 s smulkiomis dalelėmis.

- 5 Analogišku būdu pagal 1 pavyzdžio metodiką buvo ardomos ir *Chlorella vulgaris* dumblių ląstelės, siekiant išskirti baltymus.

3 pavyzdys. *Chlorella* dumblių ląstelių ardymas ir pigmentų išskyrimas

Chlorella vulgaris 269, *C.vulgaris* 896 ir *C.cf.vulgaris* dumbliai buvo kultivuoti 14 dienų Bristol modifikuotoje maitinimo terpėje, $25^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C temperatūroje, esant dirbtiniam apšvietimui.

Iš biomasės mėginio gauta 120 ml dumblių koncentrato, kuris buvo apdorojamas pagal 1 pavyzdžio metodiką, tik pridodant feromagnetinių dalelių santykiu 7:1 ir 1 min taikant 50 Hz sukamąjį magnetinį lauką, kurio magnetinio srauto tankis apdorojimo zonos centre sudarė 0,17 T. Fig. 3 (A, B) pateiktos dumblių *Chlorella vulgaris* ląstelių iki (su)ardymo (A) ir po (su)ardymo (B) mikroskopinio vaizdo nuotraukos.

Pigmentai buvo išskiriami įprastais būdais, ekstrahuojant tinkamais organiniais tirpikliais (acetonas, etilo alkoholis arba jų mišiniai). *Chlorella* pigmentų kokybinei identifikacijai panaudota plonasluoksnė chromatografija (angl. Thin Layer Chromatography, TLC). Apskaičiuoti kiekvienos pigmentų dėmės, pasiskirsčiusios ant chromatografinės plokštelės, pasiskirstymo koeficientai (Rf). Pigmentų dėmės identifikuotos lyginant jų pasiskirstymo koeficientus su žinomais pigmentų pasiskirstymo koeficientų standartais. Ant chromatografinės plokštelės iš kiekvieno *Chlorella* kultūrų ekstrakto ryškiai pasiskirstė po 4 pigmentų dėmės.

Chromatografinėje plokštelėje visų *Chlorella* ekstraktų pigmentų dėmės yra pasiskirsčiusios vienodai (Fig. 4), pigmentų įvairovė - ta pati. Apskaičiuoti TLC pasiskirstymo koeficientai ir pagal tai identifikuoti pigmentai pateikti 5-oje lentelėje.

5 lentelė

Identifikuoti pigmentai pagal pasiskirstymo koeficientus

Dėmės numeris	Dėmės spalva	Nueitas atstumas (mm)	Pasiskirstymo koeficientas, Rf	Pigmentai
1'	Ryškiai geltona	22	$22/54 = 0,407$	= Rf ksantofilų
2'	Gelsvai žalia	25	$25/54 = 0,462$	= Rf chlorofilo b

3'	Mėlynai žalia	30	$30/54 = 0,555$	= Rf chlorofilo b
4'	Gelonai oranžinė	52	$52/54 = 0,962$	= Rf β karoteno
Tirpiklių sistemos nueitas atstumas (frontas) 54 mm				

Pasiskirstymo koeficientai *Chlorella* ekstraktuose atitinka šiuos pigmentus: ksantofilus, chlorofilą a, chlorofilą b ir β karoteną. Kitų pigmentų kokybiškai aptikti nepavyko.

- Spektrofotometru išmatuota pigmentų sugertis ties atitinkamais bangų ilgiais ir pagal jos reikšmes apskaičiuotos kiekvienos *Chlorella* kultūros chlorofilo a, b, c ir karotenoidų koncentracijos (6 lentelė).

6 lentelė

Tirtų *Chlorella* kultūrų pigmentų koncentracijų reikšmės

Kultūra	Koncentracija, mg/l			
	Chl a	Chl b	Chl c	Karotenoidai
<i>Ch.v.269</i>	18,19	18,69	5,91	18,28
<i>Ch.v896</i>	20,3	19,2	6,2	22,28
<i>Ch.cf.v</i>	25,16	18,57	6,34	26,4

10

Analogiškai ardant dumblių ląsteles sukamuoju magnetiniu lauku pagal siūlomą išradimą, galima iš to paties dumblių koncentrato paeiliui išskirti daugiau nei vieną juose esančių bioproduktų, pavyzdžiui, tiek lipidus, tiek baltymus (pvz., iš *Botryococcus braunii* ar kt.).

- 15 Apdorojant dumblių ląsteles sukamuoju magnetiniu lauku pagal išradimą, darbo bloke atsiranda stiprūs lokaliniai elektromagnetiniai laukai. Kintamas magnetinis laukas kuria elektrinį lauką, o pastarojo sukurta srovė – papildomą magnetinį lauką. Be sukurtų papildomų laukų elektromagnetinės malyklės darbo bloke susidaro ir akustinės bangos – garsinės ir ultragarsinės. Jų šaltinis – judančios feromagnetinės dalelės, taip pat iššaukiančios ir kavitacijos efektą.

- 20 Esant pakankamai didelėms smūgių galioms pradeda veikti fiziniai ir cheminiai procesai, kurie normaliomis sąlygomis neįmanomi: pvz., deformuojama medžiagos kristalinė gardelė, ženkliai padidėja apdorojamų medžiagų cheminis aktyvumas. Smūgių vietoje slėgis siekia tūkstančius megapasalių, todėl dėl tokio poveikio ženkliai išauga laisvosios energijos kiekis. Be to, šį procesą dar skatina ir lokaliniai elektromagnetiniai laukai.
- 25 Sūkurinio sluoksnio tūrio vietoje sukuriama didelė galia ir, kaip minėta, visuminis poveikis lemia dumblių ląstelių sienelių greitą suardymą ir leidžia veiksmingai išskirti tikslinius ląstelėje sukauptus bioproduktus (lipidus, baltymus, pigmentus, vitaminus ir kt.) iš suardytos dumblių biomasės, naudojant mažas energijos ir laiko sąnaudas.

Būtinai ir pakankamai ląstelių sienelių suardymui elektromagnetinių laukų superpozicijos poveikis pagal išradimą ne tik leidžia greitai ir efektyviai gauti dumblių ląstelių lizata, iš kurio galima kiekybiškai išskirti dumbliuose sukauptus naudingus bioproduktus, palengvina flokuliaciją ir t.t., bet – svarbiausia – užtikrina lizuotos biomasės 5 (bioproduktais praturtintos terpės) kokybiškumą, maksimaliai išsaugo išlaisvintų bioproduktų nepakitusią cheminę sandarą ir biologinį aktyvumą, nes nenaudojami jam kenkiantys arba jį mažinantys faktoriai: aukšta temperatūra, agresyvios, aplinkai kenkiančios cheminės medžiagos (pvz., šarmai, rūgštys, abrazyvinės, paviršiaus aktyvios medžiagos (PAV), detergentai), ilgai trunkantis, didelės jėgos slėgimas.

Išradimo apibrėžtis:

1. Dumblių ląstelių ardymo ir bioproduktų išskyrimo iš jų būdas, apimantis dumblių biomasės auginimą, koncentravimą, dumblių ląstelių apdorojimą elektromagnetinio lauko poveikiu ir tikslinių bioproduktų iš dumblių ląstelių išlaisvinimą ir ekstrahavimą, besiskiriantis tuo, kad į užaugintų dumblių biomasės koncentratą prideda feromagnetinių dalelių arba nanodalelių ir ne ilgiau kaip 1 min. apdoroja kintamo sukamojo magnetinio lauko poveikiu, kurio magnetinio srauto tankis apdoravimo zonos centre yra 0,08-1 T.
- 5
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad kintamo sukamojo magnetinio lauko dažnis yra 50-400 Hz.
- 10
3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad kintamo sukamojo magnetinio lauko linijinis greitis yra 0,1-240 m/s.
- 15
4. Būdas pagal bet kurį iš 1-3 punktų besiskiriantis tuo, kad užaugintus dumblius koncentruoja pašalinant iš biomasės bent dalį vandens, optimaliai centrifuguojant, ir/arba po dumblių biomasės nucentrifugavimo pakeičiant terpę tikslinio bioprodukto išskyrimui tinkamu tirpalu ir/arba tirpikliu, įskaitant distiliuotą vandenį.
- 20
5. Būdas pagal bet kurį iš 1-4 punktų besiskiriantis tuo, kad dumblių padermės apima *Scenedesmus dimorphus*, *Nannochloropsis*, *Nannochloris*, *Spirulina platensis*, *Botryococcus braunii*, ir *Botryococcus braunii* CCALA 220, *Chlorella padermės* *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris* CCALA 269, *Chlorella vulgaris* 896, *C. cf. vulgaris* ir/arba genetiškai modifikuotus variantus, tiek monokultūros formoje, tiek ir skirtingų dumblių padermių mišinio formoje.
- 25
6. Būdas pagal bet kurį iš 1-5 punktų besiskiriantis tuo, kad bioproduktas apimą bet kurį iš dumblių ląstelėse sukauptų naudingų bioproduktų, tokių kaip lipidai, baltymai, pigmentai, vitaminai.
- 30
7. Būdas pagal bet kurį iš 1-6 punktų besiskiriantis tuo, kad tikslinį bioproduktą iš suardytų dumblių ląstelių biomasės ekstrahuoja konkrečiam bioproduktui įprastais būdais.
- 35

8. Bioproduktais praturtinta terpė po dumblių ląstelių suardymo būdu pagal 1-7 punktus, skirta konkrečių bioproduktų, tokių kaip lipidai, baltymai, pigmentai, vitaminai, išskyrimui ir ekstrahavimui.

5

9. Dumblių ląstelių ardymo ir bioproduktų išskyrimo iš jų sistema, apimanti ardymui ir bioproduktų išskyrimui skirtą dumblių ląstelių kiekį, feromagnetines daleles arba nanodaleles, kurių santykis su minėtu dumblių ląstelių kiekiu sudaro apytikriai 10-7:1, ir elektromagnetinę malyklę, skirtą apdoroti minėtą dumblių ląstelių kiekį kintamo sukamojo magnetinio lauko poveikiu pagal 1-7 punktus.

10. Sistema pagal 9 punktą, besiskirianti tuo, kad elektromagnetinė malyklė yra įrenginys, apimantis darbo bloką su aktyviaja zona, kur darbo blokas apgaubia kintamo sukamojo magnetinio lauko induktorių, kuriantį magnetinį lauką darbo bloko aktyvioje zonoje; induktoriaus žadinimo srovės galios reguliatorių; induktoriaus ir darbo bloko aušinimo mazgą; kur prie kiekvienos induktoriaus žadinimo ričių grupės yra nuosekliai prijungtas bent vienas kondensatorių grupės kondensatorius.

11. Sistema pagal 10 punktą, besiskirianti tuo, kad elektromagnetinės malyklės visų kondensatorių grupės kondensatorių parametrai parenkami taip, kad visose magnetinio lauko žadinimo fazinėse grandinėse būtų tenkinamos įtampų rezonanso sąlygos.

20

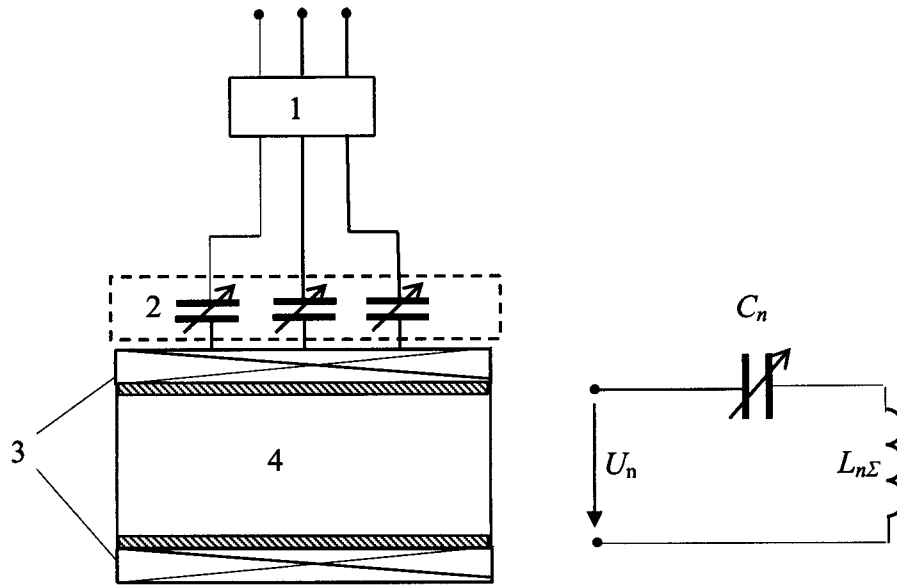


Fig. 1

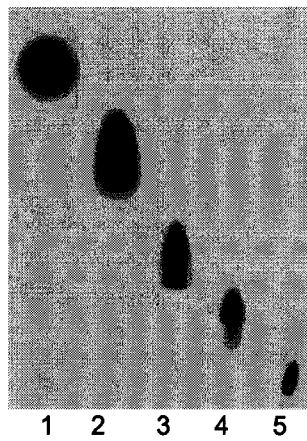
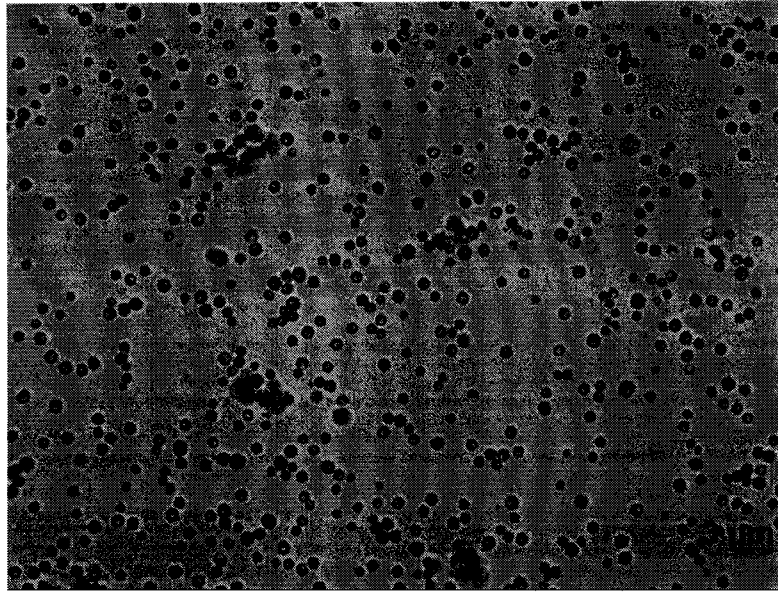
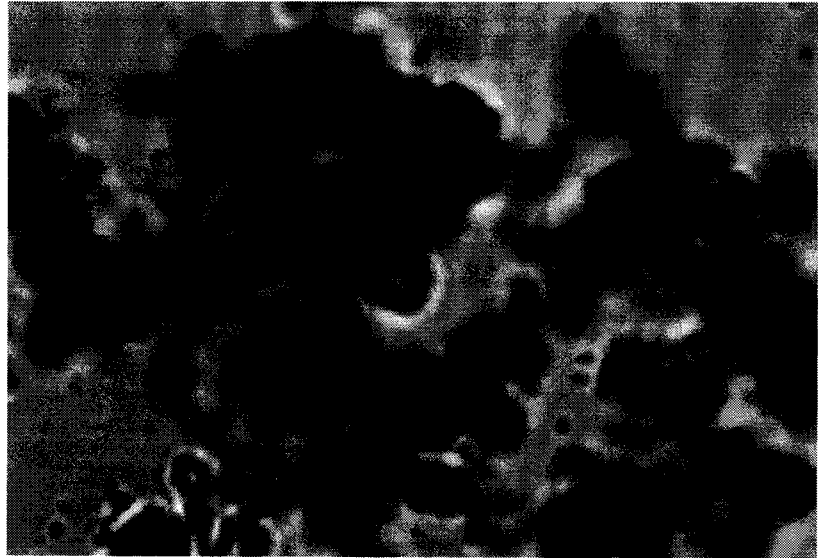


Fig. 2



A



B

Fig. 3

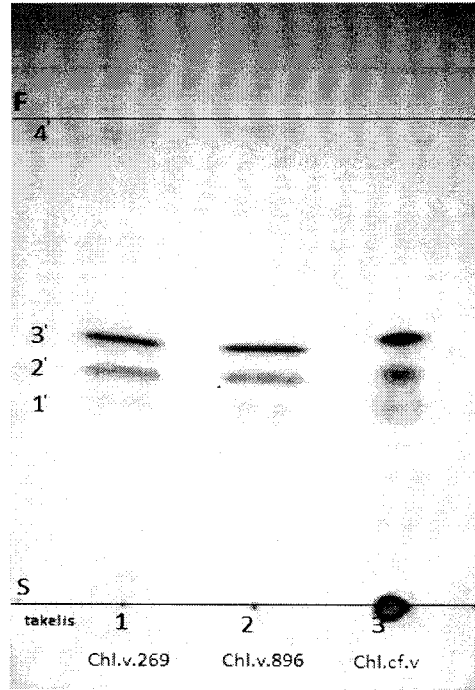


Fig. 4

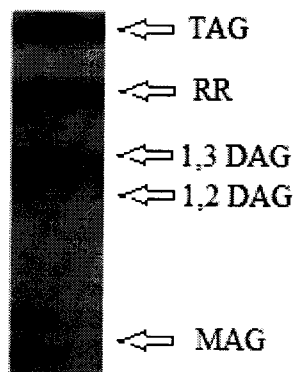


Fig. 5