

CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA BIOETANOLULUI PRIN PROCEDEE INOVATIVE DE PRETRATARE ȘI HIDROLIZĂ A BIOMASEI LIGNOCELULOZICE

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ
de către

Ing. Amalia Corina Macarie

Conducător științific: prof.univ.dr.ing Georgeta BURTICĂ
Referenți științifici: prof.univ.dr. Constantin MATEESCU
CS.I.dr.ing. Nicolae MIRICA.
prof.univ.dr.ing Peter FRANCISC

Ziua susținerii tezei: 25.01.2013

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|------------------------|---|
| 1. Automatică | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie | 8. Inginerie Industrială |
| 3. Energetică | 9. Inginerie Mecanică |
| 4. Ingineria Chimică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 5. Inginerie Civilă | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 6. Inginerie Electrică | |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2006

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității mele în cadrul Colectivului de Inginerie Chimică al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, al Universității „Politehnica” din Timișoara.

Mulțumiri deosebite se cuvin conducătorului de doctorat, doamnei prof.dr.ing. Georgeta Burtică, pentru profesionalismul cu care m-a ghidat pe drumul către obținerea titlului de doctor , pentru competența și pmanenta îndrumare științifică, pentru sprijinul real acordat pe întreaga perioadă de desfășurare a doctoratului și a elaborării tezei de doctorat.

Tema tezei de doctorat se înscrie într-un domeniu de mare actualitate, luând în considerare și problemele legate de poluarea ce reprezintă o problemă socio-economică deosebit de importantă.

Determinările experimentale au vizat în special pretraterea biomasei, întrucât această etapă este absolut esențială pentru obținerea bioetanolului, reprezentând aproximativ 30% din costul total al etanolului. Obiectivul acestui studiu este eficientizarea procesului de solubilizare totală sau parțială a celulozei și hemicelulozei, din trei tipuri diferite de biomasă: lemn esență tare, moale și biomasă de tip ierbos, prin designul, dezvoltarea și optimizarea unor metode inovative de pretratere (a microundelor, prin liofilizare și prin ultrasonare). De asemenea, s-au efectuat studii comparative asupra diferitelor procese fizice și fizico-chimice, în vederea eficientizării acestei etape, reducerea consumului de reactivi chimici.

Macarie, Amalia Corina

Cercetări privind obținerea bioetanolului prin procedee inovative de pretratare și hidroliză a biomasei lignocelulozice

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 67, Editura Politehnica, 2013, 174 pagini, 94 figuri, 52 tabele.

ISSN 1842-8223

ISBN 978-606-554-606-6

Cuvinte cheie: biomasa lignocelulozica, bioetanol, pretratare, hidroliza enzimatica

Rezumat, Obținerea bioetanolului din materii prime celulozice, deși mult studiată, rămâne o problemă complexă datorită diversității materiei prime și a dificultăților de a stabili și optimiza parametrii fiecărei etape. Principalul scop al tezei îl reprezintă studiul optimizării proceselor de pretratare și hidroliză enzimatică a biomasei lignocelulozice, pentru obținerea bioetanolului din a doua generație. Obiectivul acestui studiu este eficientizarea procesului de solubilizare totală sau parțială a celulozei și hemicelulozei, din trei tipuri diferite de biomasă: lemn esență tare, moale și biomasă de tip ierbos, prin designul, dezvoltarea și optimizarea unor metode inovative de pretratare (a microundelor, prin liofilizare și prin ultrasonare). S-au efectuat studii comparative asupra diferitelor procese fizice și fizico-chimice, în vederea eficientizării acestei etape. S-a studiat influența temperaturii, pH - ului și a naturii substratului și raportului enzimă:substrat. De asemenea, s-a studiat influența metodei de pretratare a biomasei asupra randamentului de zaharuri libere precum și influența mărimii particulelor de probă și a tipului de biomasă asupra cantității de zaharuri libere. Costul producției de bioetanol depinde foarte mult de compoziția biomasei și de tipul etapelor, inclusiv pregătirea substratului și reducerea dimensiunilor, hidroliza hemicelulozei, fermentarea zaharidelor provenite din hemiceluloză, producerea celulazelor, distilarea și tratarea reziduurilor.

CUPRINS

Cuvânt înainte	iii
	iv
Cuprins	v
Abrevieri	1
Lista figuri	2
Lista tabele	6
Introducere	9
CAPITOLUL I - Stadiul cunoașterii în domeniu	10
I.1 Noțiuni generale : biomasa, biocombustibili și bioenergia	10
I.2. Surse de obținere a biocombustibililor ecologici	11
I.3. Tipuri de biocombustibili	12
I.3.1. Biocombustibili din prima generație	12
I.3.2. Biocombustibili din generația a doua	13
I.4. Bioetanolul celulozic	14
I.4.1. Biomasa lignocelulozică	14
I.4.2. Structura biomasei	16
I.4.3. Caracterizarea biomasei lignocelulozice	22
I.5. Metode de obținere	23
I.5.1 Metoda celulolitică (calea biologică)	25
CAPITOLUL II - Metode de pretratare a lignocelulozei	26
II. 1. Metode fizice de pretratare a biomasei lignocelulozice	27
II.1.1. Pretratarea mecanică	27
II.1.2. Expandarea cu aburi	27
II.1.3. Tratarea cu apă fierbinte (LHW)	27
II.2. Metode chimice de pretratare a biomasei lignocelulozice	28
II.2.1. Hidroliza acidă	28
II.2.1.1. Hidroliza cu acid diluat	28
II.2.1.2. Hidroliza cu acid concentrat	29
II.2.2 Pretratare în mediu alcalin	31
II.2.3. Pretratarea cu solvenți organici	31
II.2.4. Pretratarea cu lichide ionice	31
II.2.4.1. Lichide ionice - generalități	31

II.2.4.2. Pretratarea materialului lignocelulozic cu lichide ionice	33
II.3. Metodele combinate de pretratere	34
II.3.1. Expandarea cu aburi în cataliză acidă	34
II.3.2. Expandarea fibrelor cu amoniac	34
II.3.3. Expandarea cu CO ₂	34
II.4. Metodele biologice	34
CAPITOLUL III - Metode de hidroliză chimică	36
III.1. Hidroliza acidă	36
III.1.1. Hidroliza cu acid diluat	36
III.1.2. Hidroliza cu acid concentrat	36
III.2. Hidroliza enzimatică	36
III.2.1. Influența caracteristicilor peretelui celular asupra procesului de zaharificare	39
III.2.2. Enzime pentru hidroliza peretelui celular	40
III.2.3. Structura celulozei	41
III.2.4. Mecanismul hidrolizei celulozei	43
III.2.5. Efecte sinergetice la acțiunea enzimelor complexului celulozic	45
III.2.6. Clasificarea procedeeleor de hidroliză enzimatică	46
III.2.6.1. Fermentarea și hidroliza separat	46
III.2.6.2. Procedeeul de zaharificare și fermentare simultană	48
III.2.6.3. Cofermentarea hexozelor și pentozelor	49
III.2.6.4. Procedeeul de bioprocetare consolidată	50
III.2.6.5. Transformarea microbiană directă	51
III.3. Descrierea procesului enzimatic	51
III.3.1. Pretraterea materiei prime	51
III.3.2. Spălarea substratului și a hidrolizatului	51
III.3.3. Hidroliză enzimatică	52
III.4. Degradarea celulozei cu microorganisme din rumen	53
PARTEA II	
CAPITOLUL IV - Materiale si reactivi utilizati, mod de lucru	56
IV.1. Motivatie, scop si obiective	56
IV.2. Materiale si reactivi utilizati	58
IV.2.1. Achiziția enzimelor	59
IV.3. Determinarea activității celulozelor achiziționate	59

IV.3.1. Prepararea reactivilor necesari	59
IV.3.1.2. Soluție NaOH 10,67%	59
IV.3.1.3. Soluție substrat CMC 2%	59
IV.3.1.4. Soluție de acid 3,5-dinitrosalicilic (DNS) 1%	60
IV.3.1.5. Soluții standard de glucoză	60
IV.3.1.6. Soluția de celulază	60
IV.3.2. Determinarea activității celulazei	60
Concluzii parțiale	63
CAPITOLUL V - Caracterizarea fizico-chimica a materiei prime	64
V.1. Umiditatea biomasei lemnoase	64
V.2. Continutul de solide totale	65
V.3. Determinarea carbonului organic total	66
V.4. Analiza cantitativa prin microscopie de baleiaj/EDAX	67
V.5. Spectroscopie de absorbtie atomica	72
V.6. Analiza calitativa prin spectroscopia FT-IR	73
Concluzii parțiale	75
CAPITOLUL VI - Pretratate biomasei lignocelulozice	76
VI.1. Hidroliza acida	76
VI.2. Determinarea conținutului de lignină din biomasa pretratata	76
VI.2.1. Determinarea ligninei insolubile in acid din biomasa	76
VI.2.2. Determinarea ligninei solubile in acid din biomasa	77
VI.3. Determinarea continutului total de hidrati de carbon	79
VI.3.1. Etalonare pentru analizele HPLC de hidrati de carbon	79
VI.3.2. Analiza hidraților de carbon totali după hidroliza enzimatică a biomasei	83
VI.3.3. Determinarea hidratilor de carbon din bioasa lignocelulozica netratata, pretratata si din celuloza pura microcristalina AVICEL	82
VI. 4. Pretratate fizico-chimica a biomasei lignocelulozice	85
VI. 4.1. Pretratate combinată cu acid și microunde a biomasei celulozice	85
VI.4.1.1. Determinarea conținutului total de hidrați de carbon din soluțiile obținute după pretratament	88
VI.4.2. Pretratate combinată cu acid/bază și liofilizare a biomasei celulozice	90

VI.4.2.1. Determinarea conținutului total de hidrați de carbon din soluțiile obținute după pretratament	90
VI.4.3. Ultrasonare biomasei celulozice	91
VI.5. Caracterizarea fizico - chimica a biomasei pretratate prin ultrasonare	91
VI.5.1. Analiza calitativă prin spectroscopia FT-IR	91
VI.5.2. Analiza calitativă prin microscopie electronică de baleiaj/EDAX	95
<u>Concluzii parțiale</u>	98
CAPITOLUL VII - Hidroliza enzimatică	100
VII.1. Reactivi și aparatură	100
VII.2. Metode de analiză	100
VII.2.1. Metoda Lowry de determinare a proteinelor	100
VII.2.1.1. Etalonarea soluției de BSA prin metoda Lowry	100
VII.2.1.2. Determinarea conținutului în proteine dintr-o probă necunoscută	102
VII.2.2. Determinarea activității celulazei	102
VII.2.2.1. Etalonare standarde de glucoză	102
VII.2.2.2. Determinarea propusă a activității celulazei	104
VII.3. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei din culturi de microorganisme în condiții anaerobe	104
VII.3.1. Substraturi și condiții de cultură pentru obținerea de celulaze extracelulare	106
VII.3.1.1. Culturi de Trichoderma reesei	106
VII.3.1.2. Culturi de Zymomonas mobilis	106
VII.3.1.3. Culturi de Butyrivibria fibrisolvens	107
VII.3.2. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei	107
VII.3.2.1. Celulaze din Trichoderma reesei	107
VII.3.2.2. Celulaze din Zymomonas mobilis	108
VII.3.2.3. Celulaze produse de microorganismele din rumen	109
VII.4. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei din culturi de microorganisme în condiții aerobe	110
VII.4.1. Substraturi și condiții de cultură pentru obținerea de celulaze extracelulare	111
VII.4.1.1. Culturi de Trichoderma reesei	111
VII.4.1.2. Culturi de Zymomonas mobilis	111

VII.4.1.3. Culturi de <i>Butyrivibria fibrisolvens</i>	111
VII.4.2. Obținerea celulozelor din culturi de microorganisme	112
VII.4.2.1. Celulaze din <i>Trichoderma reesei</i>	112
VII.4.2.2. Celulaze din <i>Zymomonas mobilis</i>	113
VII.4.2.3. Celulaze produse de microorganismele din rumen	113
VII.5. Efectuarea hidrolizei celulozei cu ajutorul enzimelor	115
VII.5.1. Influența naturii substratului și raportului enzima:substrat	115
VII.5.2. Influența temperaturii	120
VII.5.3. Influența pH - ului	121
VII.6. Hidroliza enzimatică a materialelor pretratate	122
VII.7. Studiul comparativ asupra eficienței tipurilor de microorganisme utilizate în sinteza producerii bioetanolului	130
VII.7.1. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei din culturi de microorganisme	130
VII.7.2. Degradarea celulozei de către enzimele obținute din <i>Trichoderma reesei</i>	130
VII.7.3. Fermentarea zaharului cu enzime din <i>Zymomonas mobilis</i>	131
VII.7.4. Determinarea conținutului total de zahăr	131
VII.7.5. Degradarea celulozei de către enzimele obținute din <i>Trichoderma reesei</i> și <i>Zymomonas mobilis</i>	135
VII.8. Studiul comparativ asupra eficienței tipurilor de pretratare a biomasei lignocelulozice	136
VII.8.1. Pretratarea biomasei	136
VII.8.2. Hidroliza enzimatică a biomasei pretratate	136
VII.8.3. Influența metodei de pretratare a biomasei asupra randamentului de zahăruri libere	138
VII.8.4. Influența mărării particulelor de rumeguș (cernut/macinat) asupra cantității de zahăruri libere	138
VII.8.5. Influența tipului de biomasa asupra cantității de zahăruri libere	139
<u>Concluzii parțiale</u>	141
CAPITOLUL VIII - Studiu economic	143
VIII.1. Obiectivele pretrării	143
VIII.2. Analiza SWOT	143
VIII.3. Factorii dezvoltării producției de biocombustibil și piața	144

biocombustibililor	
VIII.4. Aspecte economice în ceea ce privește producția de bioetanol din biomasă lignocelulozică	144
VIII.5. Avantaje ale valorificării deșeurilor lemnoase	146
<u>Concluzii parțiale</u>	146
CAPITOLUL IX – Concluzii finale	147
Bibliografie	153

Abrevieri

AFEX, AMFE - Expandarea fibrelor cu amoniac
BSA - albumină serică de bovină
Conc - concentrație
CMC - carboximetilceluloză
CBP - Procedeu de bioprosesare consolidată
DMC - Transformarea microbiană directă
DNS - soluție de acid 3,5-dinitrosalicilic
EDAX - spectrometrie cu dispersie după energie
FT- IR - spectroscopia de FT-IR
IC - carbon anorganic
ILS - lichide ionice
LHW -Tratarea cu apă fierbinte
MeTMOS - metiltrimetoxisilan 98% (Merck)
RT - timp de retenție
PhTMOS - feniltrimetoxisilan 99% (Fluka),
TOC - carbon organic total
TC - carbon total
TMOS - tetrametoxisilan 98%
SEM - microscopie electronică de baleiaj
SHF - Fermentarea și hidroliza separat
SSF - Procedeu de zaharificare și fermentare simultană
SSCF - Cofermentarea hexozelor și pentozelor

LISTA DE FIGURI

- Figura I.1.** Principalele procedee de transformare a biomasei
Figura I.2. Biocombustibili lichizi pentru automobile
Figura I.3. Foaia de parcurs în domeniul biocarburanților lichizi
Figura I.4. Procesul de obținere a bioetanolului din biomasă lignocelulozică
Figura I.5. Biomasa lignocelulozică
Figura I.6. Componentele principale ale biomasei lignocelulozice
Figura I.7. Reprezentarea schematică a lanțului de celuloză
Figura I.8. Structura schematică a hemicelulozei
Figura I.9. Compoziția ligninei
Figura I.10. Greutatea estimată a combustibilului
Figura I.11. Volumul combustibilului estimat
Figura I.12. Cantitatea de cenușă estimată
Figura I.13. Volumul de cenușă estimat
Figura I.14. Principalele procedee de transformare a biomasei în etanol
Figura I.15. Reprezentarea schematică a metodei celuloitice
Figura II.1. Hidroliza cu acid diluat
Figura II.2. Hidroliza cu acid concentrat
Figura II.3. Evoluția generațiilor de lichide ionice
Figura II.4. Transformarea biologică a biomasei celulozice în etanol
Figura III.1. Diagrame structurale prezentând plierile cunoscute ale domeniilor catalitice din clanuri și familii reprezentative de celulaze
Figura III.2. Mecanismul ipotetic al hidrolizei enzimatică a celulozei cu celulază din *T. reesei*
Figura III.3. Cele trei tipuri de reacții catalizate de celulaze
Figura III.4. Hidroliza și fermentarea separată (SHF)
Figura III.5. Reprezentarea schematică a obținerii etanolului din lignoceluloză printr-un proces SSF
Figura III.6. Tulpini de microorganisme modificate genetic pentru producerea etanolului din pentoze
Figura III.7. Zaharificarea și fermentarea simultană (SSF)
Figura III.8. Reprezentarea schematică a etapelor tehnologice în procedeul de cofermentare a hexozelor și pentozelor (SSCF)
Figura III.9. Reprezentarea schematică a procedeului de bioprosesare consolidată
Figura III.10. A) *Butyrivibrio fibrisolvens*, B) *Ruminococcus albus* și C) *Ruminococcus flavefaciens*
Figura IV.1. Etalonare standarde de glucoză
Figura V.1. Reprezentarea grafică a umidității în funcție de tipul biomasei lemnoase
Figura V.2. Imagini SEM efectuate pentru bioamasa netratată de brad
Figura V.3. Spectrele EDAX al bioamasei netratată de brad
Figura V.4. Imagini SEM efectuate pentru bioamasa netratată de cânepă
Figura V.5. Spectrele EDAX al bioamasei netratată de cânepă
Figura V.6. Imagini SEM efectuate pentru bioamasa netratată de salcâm

Figura V.7.	Spectrele EDAX al bioamasei netratată de salcâm
Figura V.8.	Imagini SEM efectuate pentru bioamasa netratată de stejar
Figura V.9.	Spectrele EDAX pentru analiză elementară a bioamasei netratată de stejar
Figura V.10.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru bioamasa netratată de brad
Figura V.11.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru bioamasa netratată de cânepă
Figura V.12.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru bioamasa netratată de stejar
Figura V.13.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru bioamasa netratată de salcâm
Figura VI.1.	Cromatograma HPLC de la etalonarea glucozei și xilozei cu standard intern lactoză (4 mg/ml glucoză, 4 mg/ml xiloză, 5 mg/ml lactoză)
Figura VI.2 .	Caracteristica de etalonare a glucozei cu standard intern lactoză
Figura VI.3.	Caracteristica de etalonare a xilizei cu standard intern lactoză
Figura VI.4.	Graficul de etalonare pentru xiloza cu standard intern manitol
Figura VI.5.	Cromatograma HPLC a probei 4 (biomasa de stejar) de la etalonarea xilozei cu standard intern manitol (2 mg/mL xiloza, 5mg/mL manitol)
Figura VI.6.	Cromatograma HPLC a probei 3 (biomasa de plop) (3 mg/mL) de la etalonarea glucozei
Figura VI.7.	Cantitatea de zaharuri totale
Figura VI.8.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru bioamasa netratată și pretrată de brad
Figura VI.9.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru bioamasa netratată și pretrată de cânepă
Figura VI.10.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru bioamasa netratată și pretrată de salcâm
Figura VI.11.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru bioamasa netratată și pretrată de stejar
Figura VI.12.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru cele patru tipuri biomasă netratată
Figura VI.13.	Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru cele patru tipuri biomasă pretrată prin ultrasonare
Figura VI.14.	Imagini SEM efectuate pentru bioamasa netratată și pretrată de brad
Figura VI.15.	Spectrele EDAX al bioamasei netratată și pretrată de brad
Figura VI.16.	Imagini SEM efectuate pentru bioamasa netratată și pretrată de cânepă
Figura VI.17.	Spectrele EDAX al bioamasei netratată și pretrată de cânepă
Figura VI.18.	Imagini SEM efectuate pentru bioamasa netratată și pretrată de salcâm
Figura VI.19.	Spectrele EDAX al bioamasei netratată și pretrată de salcâm
Figura VI.20.	Imagini SEM efectuate pentru bioamasa netratată și pretrată de stejar
Figura VI.21.	Spectrele EDAX pentru analiză elementară a bioamasei netratată și pretrată de stejar
Figura VII.1.	Caracteristica de etalonare a soluției de BSA prin metoda Lowry
Figura VII.2.	Etalonare standarde de glucoză

4 Lista de figuri

- Figura VII.3.** Evoluția în timp a activității celulozei produse de *Trichoderma reesei* și a cantității de glucoză
- Figura VII.4.** Evoluția în timp a activității celulozei produse de *Butyrivibria fibrisolvens* și a cantității de glucoză
- Figura VII.5.** Evoluția în timp a activității celulozei produse de *Trichoderma reesei* și a cantității de glucoză
- Figura VII.6.** Evoluția în timp a activității celulozei produse de *Butyrivibria fibrisolvens* și a cantității de glucoză
- Figura VII.7.** Evoluția în timp a hidrolizei celulozei Avicel la diferite concentrații de Accelerase 1000
- Figura VII.8.** Evoluția în timp a hidrolizei celulozei Avicel la diferite concentrații de Celluclast 1.5L
- Figura VII.9.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82%, folosind complexul celulazic Accelerase 1000, la 40°C
- Figura VII.10.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82%, folosind Celluclast 1.5L, la 40°C
- Figura VII.11.** Dependența de temperatură a hidrolizei rumegușului de plop și brad pretratate cu H₂SO₄ 0,82%, folosind complexul celulazic Accelerase 1000
- Figura VII.12.** Dependența de temperatură a hidrolizei rumegușului de plop și brad pretratate cu H₂SO₄ 0,82%, folosind Celluclast 1.5L
- Figura VII.13.** Dependența de pH a hidrolizei rumegușului de salcâm și brad pretratate cu H₂SO₄ 0,82%, folosind Accelerase 1000
- Figura VII.14.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82%, folosind complexul celulazic Accelerase 1000, la 40°C
- Figura VII.15.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82%, folosind Celluclast 1.5L, la 40°C
- Figura VII.16.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82%, folosind complexul celulazic Accelerase 1000 și 50 mg BSA, la 50°C
- Figura VII.17.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă liofilizată (cu sol NaOH 1% sau HCl 1% la -52°C timp de 25 ore), folosind complexul celulazic Accelerase 1000, la 40°C
- Figura VII.18.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82% (program temperatură: 120-160°C, timp de 10 min), folosind complexul celulazic Accelerase 1000 la 40°C
- Figura VII.19.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82% (program temperatură: 120-160°C, timp de 10 min), folosind Celluclast 1.5L, la 40°C
- Figura VII.20.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82% (program temperatură: 120 și 140°C, timp de 30 min), folosind complexul celulazic Accelerase 1000 la 40°C
- Figura VII.21.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82% (program temperatură: 120 și 140°C, timp de 30 min), Celluclast 1.5L, la 40°C
- Figura VII.22.** Evoluția în timp a hidrolizei biomasei de cânepă pretrată cu H₂SO₄ 0,82% (program temperatură: 120, 140 și 160°C, timp

- de 30 min), folosind complexul celulazic Accelerase 1000 la 40°C
- Figura VII.23.** Randamentul de zaharuri totale obtinute din celuloză (sunt prezentate cele mai bune rezultate pentru fiecare cultură duplicat)
- Figura VII.24.** Conținutul total de zahăr după fermentarea glucozei cu *Zymomonas mobilis*
- Figura VII.25.** Conținutul total de zaharuri netransformate după acțiunea amestecului *t. reesei* – *z. mobilis*
- Figura VII.26.** Influența metodei de pretratare asupra hidrolizei enzimaticice pe diferite tipuri de biomasă
- Figura VII.27.** Influenta dimensiunii particulelor de biomasă in reactia de hidroliza enzimatica
- Figura VII.28.** Formarea zaharurilor din hidroliza enzimatică a rumegușului pretratat rezultat din canepa
- Fig.VII.29.** Formarea zaharurilor din hidroliza enzimatică a rumegușului pretratat rezultat din stejar
- Fig.VII.30.** Formarea zaharurilor din hidroliza enzimatică a rumegușului pretratat rezultat din brad

LISTA DE TABELE

Tabelul I.1.	Biocombustibili din prima generație
Tabelul I.2.	Biocombustibili din a doua generație
Tabelul I.3.	Compoziția chimică a materiilor prime și producția de etanol corespunzătoare
Tabelul I.4.	Compoziția principalelor reziduuri agricole utilizate la obținerea etanolului
Tabelul I.5.	Compoziția biomasei lignocelulozice (% masă uscată)
Tabelul II.1.	Analiza comparativă a principalelor metode de pretratare a biomasei
Tabelul III.1.	Analiza comparativă a celor trei metode de hidroliză a celulozei
Tabelul III.2.	Comparație între hidroliza acidă și hidroliza enzimatică a biomasei lignocelulozice
Tabelul IV.1.	Mod de lucru schematic al determinării activității celulozei
Tabelul IV.2.	Activitatea unor soluții de enzimă
Tabelul V.1.	Caracterizarea biomasei
Tabelul V.2.	Rezultatele determinării conținutului de carbon total (TC) din probele analizate
Tabelul V.3.	Rezultatele determinării conținutului de carbon anorganic (IC) din probele analizate
Tabelul V.4.	Valorile carbonului organic total din probele de rumeguș
Tabelul V.5.	Concentrația metalelor în biomasa lignocelulozică
Tabelul VI.1.	Cantitatea procentuală de lignină insolubilă în acid, corespunzătoare diferitelor tipuri de biomasă luate în lucru
Tabelul VI.2.	Cantitatea de lignină solubilă în acid din hidrolizat (faza lichidă) obținută pentru tipurile de biomasă în urma pretratării în mediu acid
Tabelul VI.3.	Cantitatea de lignină solubilă în acid din biomasa solidă obținută
Tabelul VI.4.	Masa reziduului solid de la hidroliza biomasei înainte și după procesul de uscare
Tabelul VI.5.	Rezultatele etalonării glucozei și xilozei prin metoda standardului intern cu lactoză
Tabelul VI.6.	Rezultatele etalonării xilozei prin metoda standardului intern cu manitol
Tabelul VI.7.	Rezultatele etalonării xilozei prin metoda răspunsului detectorului LSD
Tabelul VI.8.	Conținutul total de hidrați de carbon și lignină din biomasa lignocelulozică
Tabelul VI.9.	Conținutul de zaharuri din probele de rumeguș netratat și celuloză pură Avicel
Tabelul VI.10.	Analiza hidraților de carbon totali (exprimați ca glucoză) din soluțiile (filtrat+ ape de spălare) rezultate după pretratamentul probelor de rumeguș cernut/măcinat (Metoda 1)

Tabelul VI.11.	Analiza hidraților de carbon totali (exprimați ca glucoză) din soluțiile (filtrat+ ape de spălare) rezultate după pretratamentul probelor de rumeguș măcinat (Metoda 2)
Tabelul VI.12.	Analiza hidraților de carbon totali (exprimați ca glucoză) din soluțiile (filtrat+ ape de spălare) rezultate după pretratamentul probelor măcinate (120°C, 140°C și 160°C la timpul de 5,15 și 30 minute) (Metoda 3)
Tabelul VI.13.	Analiza hidraților de carbon totali (exprimați ca glucoză) din soluțiile (filtrat+ ape de spălare) rezultate după pretratamentul probelor de rumeguș liofilizat
Tabelul VI.14.	Analiza zaharurilor printru biomasa lignocelulozică prin HPLC
Tabelul VII.1.	Etalonarea soluției de BSA prin metoda Lowry
Tabelul VII.2.	Prepararea soluțiilor standard de glucoză
Tabelul VII.3.	Modul de lucru schematic
Tabelul VII.4.	Mod de lucru schematic al determinării activității celulozei
Tabelul VII.5.	Activitatea celulozică și conținutul total de proteine în culturile de <i>Trichoderma reesei</i>
Tabelul VII.6.	Conținutul total de proteine în culturile de <i>Zymomonas mobilis</i>
Tabelul VII.7.	Activitatea celulozică și conținutul total de proteine în culturile de <i>Butyrivibria fibrisolvens</i>
Tabelul VII.8.	Activitatea celulozică și conținutul total de proteine în culturile de <i>Trichoderma reesei</i>
Tabelul VII.9.	Conținutul total de proteine în culturile de <i>Zymomonas mobilis</i>
Tabelul VII.10.	Activitatea celulozică și conținutul total de proteine în culturile de <i>Butyrivibria fibrisolvens</i>
Tabelul VII.11.	Hidroliza celulozei Avicel cu diferite concentrații de Accelerase 1000
Tabelul VII.12.	Hidroliza celulozei Avicel cu diferite concentrații de Celluclast 1.5L
Tabelul VII.13.	Hidroliza cu Accelerase 1000 a biomasei din rumeguș pretratată, la 60°C și pH 6,0
Tabelul VII.14.	Hidroliza cu Accelerase 1000 a biomasei din rumeguș pretratată, la 50°C cu sau fără adaos de albumină
Tabelul VII.15.	Cantitatea de proteină din soluția rezultată la hidroliza cu Accelerase 1000 a biomasei din rumeguș pretratată, la 50°C cu adaos de albumină
Tabelul VII.16.	Concentrațiile maxime teoretice ale zaharurilor totale și etanolului, considerând eficiența maximă a proceselor de hidroliză și fermentare
Tabelul VII.17.	Rezultatele de hidroliză a celulozei în zaharuri fermentabile datorită enzimelor obținute din <i>Trichoderma reesei</i>
Tabelul VII.18.	Conținutul total de zahăr obținut experimental și concentrația de etanol calculate teoretic la fermentarea zaharurilor cu <i>Zymomonas</i>
Tabelul VII.19.	Conținutul total de zahăr la acțiunea amestecului <i>t. reesei</i> – <i>z. mobilis</i> asupra substraturilor celulozice
Tabelul VII.20.	Rezultatele de la hidroliza enzimatică a rumegușului liofilizat cu Accellerase™ 1000 la 40 ° C folosit ca biomasă
Tabelul VII.21.	Rezultatele hidrolizei enzimatică a rumegușului cernut (I) /

8 Lista de tabele

Tabelul VIII.1.	macinat (II) pretratat cu Accellerase TM 1000, la 40 ° C
Tabelul VIII.2.	Costurile totale de investiție, costurile de operare și venituri
	Indicatorii financiari

INTRODUCERE

Studiile efectuate asupra compoziției chimice a atmosferei au demonstrat că aceasta se modifică în special, datorită activităților umane, care generează cantități semnificative de gaze poluante.

Poluarea reprezintă o problemă socio-economică deosebit de importantă, întrucât provoacă schimbări climatice, distrugerea stratului de ozon, care influențează dezvoltării durabile a sistemului natural și socio-economic. Preocupările legate de schimbările climatice produse de poluare au impus stabilirea și adoptarea unor modalități privind reducerea emisiilor de gaze cu efect de seră. Politica europeană de mediu a acordat o atenție deosebită transportului, deoarece acest sector economic, cu o dezvoltare continuă (aproximativ 2% anual) este principalul responsabil în ceea ce privește creșterea emisiilor de gaze cu efect de seră. Transportul rutier generează cea mai mare parte (aproximativ 84%) din totalul emisiilor de dioxid de carbon provenite din transport.

Cererea de biocarburanții a înregistrat în ultimii ani creșteri semnificative, pentru că limitează emisiile poluante, astfel încât amestecarea lor cu carburanții convenționali atrage o combustie mai bună și au un efect benefic prin reducerea particulelor poluante, monoxidului de carbon și a altor poluanți.

Directiva 2003/30/CE („Directiva privind biocarburanții”) a avut ca obiectiv promovarea utilizării într-o pondere mai mare de biocarburanți, iar Directiva 2009/28/CE („Directiva privind promovarea energiei regenerabile”) și prin Directiva 2009/30/CE, acesta au consolidat obiectivul privind utilizarea biocarburanților. Statele membre impun furnizorilor să reducă cât de treptat posibil emisiile de gaze cu efect de seră generate pe durata ciclului de viață pe unitate de energie de către carburanții și energia furnizate, cu până la 10 % până la 31 decembrie 2020.

În viitor, cel mai probabil, vom folosi din ce în ce mai mult un amestec de benzină cu 10-15% etanol. În timp, odată cu modificarea mașinilor din fabrică pentru a rezista la acest amestec, mixul de benzină-etanol va crește ajungând chiar la 20%.

Bioetanolul se obține dintr-o varietate mare de produse vegetale, cum ar fi cereale, porumb, fructe, sfecla de zahăr, resturi vegetale, rumeguș de lemn, deșeuri de hârtie. Biomasa pe baza de lignoceluloză, cum ar fi reziduurile agricole (cocenii, paie), rumegușul de lemn, este un material atractiv pentru producția de bioetanol, fiind cea mai abundentă resursă reproductibilă de pe pământ.

Biomasa lignocelulozică este alcătuită din trei compuși principali: *celuloza* (40-50%), *hemiceluloza* (25-35%), *lignina* (15-20%) și cantități mici de proteine, lipide (ceruri, uleiuri), acizi, săruri minerale. Din materialele lignocelulozice se obține etanol prin celulozică (hidroliză și fermentare) sau prin intermediul unor procedee chimice: gazeificare și fermentare sau reacție catalitică.

Principalul scop al tezei îl reprezintă studiul optimizării proceselor de pretratare și hidroliză enzimatică a biomasei lignocelulozice, pentru obținerea bioetanolului din a doua generație.

Cercetările abordate în teză au vizat în special pretratarea biomasei, întrucât această etapă este absolut esențială pentru obținerea bioetanolului, reprezentând aproximativ 30% din costul total al etanolului.

CAPITOLUL I

Stadiul cunoașterii în domeniu

I.1 Noțiuni generale : biomasa, biocombustibili și bioenergia

Biomasa este partea biodegradabilă a produselor, deșeurilor și reziduurilor din agricultură, inclusiv substanțele vegetale și animale, silvicultură și industriile conexe, precum și partea biodegradabilă a deșeurilor industriale și urbane. (Definiție cuprinsă în Hotărârea nr. 1844 din 2005 privind promovarea utilizării biocarburanților și a altor carburanți regenerabili pentru transport).

Biomasa reprezintă resursa regenerabilă cea mai abundentă de pe planetă. Aceasta include absolut toată materia organică produsă prin procesele metabolice ale organismelor vii. Biomasa este prima formă de energie utilizată de om, odată cu descoperirea focului.

Biocombustibilii, în general, reprezintă orice tip de combustibil ce rezultă din biomasă în urma unui proces de prelucrare sau conversie a ei. Într-un sens mai îngust biocombustibilii sunt biocarburanți și pentru transport sub formă lichidă sau gazoasă, produși din biomasă.

Bioenergia este un alt termen generic care se referă la energia chimică înmagazinată în biomasă și posibil a fi valorificată, sau la energia obținută din biomasă în urma unui proces de conversie; arderea biomasei este doar unul dintre aceste procese. Tehnologiile moderne permit transformarea biomasei în biocombustibili fosili la încălzirea încăperilor, producerea energiei electrice și în transport [1].

Biomasa înglobează orice material regenerabil de natură organică, cuprinzând vegetalele terestre (culturi agricole de uz alimentar, pomi și culturi destinate producerii de energie, plante industriale, nutrețuri) și acvatice (algele, ierburile de mare), precum și ansamblul de deșeuri și reziduuri organice din agricultură, piscicultură, silvicultură, deșeuri municipale și alte deșeuri.

Importanța biomasei a crescut considerabil în ultimele două - trei decenii, odată cu diminuarea rezervelor mondiale de hidrocarburi fosile și prețul fluctuant la barilul de petrol, au creat premise favorabile abordării altor surse pentru obținerea de combustibili. De asemenea, și legislația restrictivă referitoare la nivelul de poluare al mediului produsă de gazele de ardere ale combustibililor convenționali contribuie la găsirea de noi surse de energie. Astfel, au apărut preocupări pentru fabricarea de biocarburanți din materii prime regenerabile. Mai mult, unele țări ale Comunității Europene au legiferat o serie de politici și reglementări ce favorizează dezvoltarea domeniului biocombustibililor (reduceri ale accizelor pentru carburanți, credite acordate fermierilor pentru obținerea de biomasă etc.).

Biomasa nu înseamnă doar materia organică provenită din procesul de creștere a plantelor agricole și din silvicultură, ea este un termen generic care se referă la orice materie organică de origine vegetală și/sau animală, disponibilă și regenerabilă prin procese naturale sau ca produs/subprodus al unei activități umane.

I.2. Surse de obtinere a biocombustibililor ecologici

Biomasa constituie o sursă regenerabilă de energie, bazată pe ciclul carbonului, spre deosebire de celelalte surse naturale, cum sunt: petrolul, cărbunii sau combustibilii nucleari. Combustibilii proveniți din biomasă s-au folosit din cele mai vechi timpuri pentru încălzire și generarea electricității, însă descoperirea combustibililor fosili: cărbunii, gazele de sondă și petrolul au condus la diminuarea dramatică a cantității de biocombustibili utilizați. Apariția și dezvoltarea industriei automobilelor a reprezentat practic momentul în care au început să se utilizeze biocombustibili lichizi (etanol și uleiul de arahide). Aceștia au fost însă înlocuiți cu combustibili derivați din ulei mineral (petrol), atunci când prețul țițeiului a scăzut, datorită rezervelor descoperite în Texas și Pennsylvania. Înainte de cel de-al doilea război mondial, utilizarea biocombustibililor a reprezentat o alternativă la importul de petrol.

Producția, în continuă creștere, a biocombustibililor ecologici, care constituie o alternativă avantajoasă a combustibililor petrolieri și a gazului natural, se bazează pe folosirea materiei organice ieftine (celuloză, reziduuri din agricultură, nămolul rezultat din stațiile de epurare a apelor). Biomasa poate fi însă, utilizată și direct pentru producerea căldurii sau energiei.

Consumul mondial de energie a crescut cu 17% în ultimul secol iar emisiile de CO₂, SO₂ și NO_x din combustibilii fosili sunt principalele cauze ale poluării atmosferei. Rezervele de petrol cunoscute se estimează că se epuizează în mai puțin de 50 de ani [2].

Utilizarea biocombustibililor, fiind biodegradabili, conduc la: reducerea emisiilor de gaze cu efect de seră, diminuarea consumului de combustibili fosili, creșterea dezvoltării rurale, creșterea națională a securității energiei și reprezintă surse regenerabile și inepuizabile de combustibili pentru viitor [2].

Principalele procedee de conversie a biomasei sunt prezentate în figura I.1:

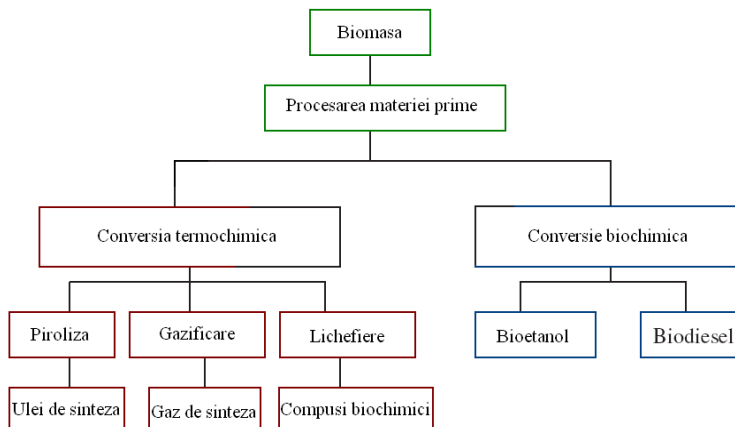


Figura I.1. Principalele procedee de transformare a biomasei [2]

I.3. Tipuri de biocombustibili

Biocombustibilii sunt reprezentați de: alcooli, esteri, eteri sau alți compuși chimici care sunt obținuți direct din biomasă celulozică (plante ierboase și lemnoase), sau indirect din deșeuri provenite din agricultură, silvicultură și o mare parte provenită din deșeuri solide municipale (activități comerciale sau domestice) și industriale.

Biocombustibilii se pot obține prin *două procedee*:

- fermentare anaerobă a produșilor biodegradabili (deșeuri provenite din agricultură, silvicultură sau activități gospodărești) cu producere de biogaz;
- obținerea biocombustibililor de generația a doua (combustibilii se pot obține din orice sursă de biomasă: paie, cherestea, îngrășământ, tărâțe de orez, ape menajere, deșeuri alimentare) [2].

În figura I.2 sunt prezentați principalii *combustibili lichizi pentru automobile*.

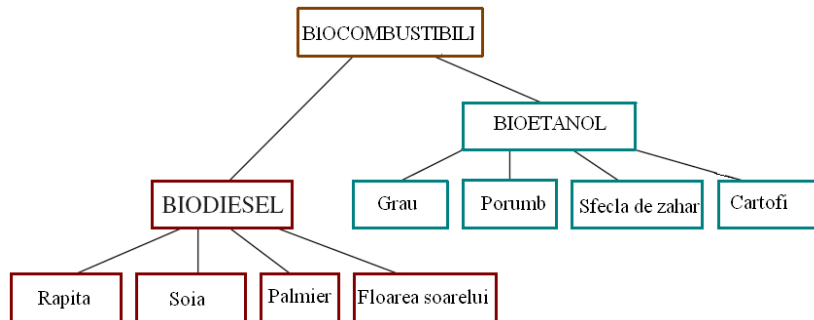


Figura I.2. Biocombustibili lichizi pentru automobile[3]

I.3.1. Biocombustibili din prima generație

Termenul de „*biocombustibili din prima generație*” se referă la biocombustibilii obținuți din zahăr, amidon, uleiuri vegetale sau grăsimi animale utilizând o tehnologie convențională. Cei mai cunoscuți biocombustibili de acest tip sunt: uleiurile vegetale, biodieselul, bioalcooli (biobutanol, bioetanol, biometanol), biogazul (biohidrogen), biocombustibilii solizi (lemn, cărbune, excremente uscate) [2].

Tabelul I.1. Biocombustibili din prima generație [4]

Biocombustibili	Materia primă	Tehnologia de conversie
Ulei vegetal pur	Culturi de plante oleaginoase (rapia, soia, floarea soarelui, palmier, ricin etc.)	Extracție prin presare la rece
Biodiesel	- Culturi de plante oleaginoase (rapia, soia, floarea soarelui, palmier, ricin etc.) - Uleiuri arse, reziduale	- Extracție prin presare la rece, purificare și transesterificare - Hidrogenare
Bioetanol	Sfecla de zahăr, trestia de zahăr, cereale	Hidroliză și fermentație
Biogaz	Biomasă umedă	Digestie anaerobă
Bio-ETE	Bioetanol	Sinteza chimică

Evaluarea câștigurilor în domeniul mediului:

- ✓ Evaluarea contribuției pe care o poate aduce utilizarea biocombustibililor la reducerea poluării cu CO₂;
- ✓ Identificarea celor mai evidente utilizări unde efectul înlocuirii actualelor sisteme (transport, electricitate, încălzire) cu sisteme utilizând biocombustibili, este maxim;
- ✓ Promovarea de culturi sustenabile pentru asigurarea producției de biocombustibili;
- ✓ Cercetări în domeniul presiunii de vapori în motorină, etanol, motorină și derivate pentru a determina cotele de amestec tehnic și economic fezabile [4].

I.3.2. Biocombustibili din generația a doua

Obținerea acestei categorii de biocombustibili implică doar utilizarea unor materii prime care nu sunt comestibile: tulpini de grâu și porumb, lemn, biomasă cultivată (de exemplu, genul *Miscanthus*) sau diverse deșeuri. Se referă la biocombustibilii obținuți din biomasă, inclusiv biocombustibilii celulozici. Sunt gaze obținute prin gazificarea biomasei: biohidrogen, bio-DME, biometanol, DMF, motorina Fisher-Tropsch, motorina obținută din deșeuri de lemn, amestecuri de alcooli (amestec de etanol, propanol și butanol cu pentanol, hexanol, heptanol și octanol), microalge [2].

Tabelul I.2. Biocombustibili din a doua generație [4]

Biocombustibili	Materia primă	Tehnologia de conversie
Bioetanol Bioetanol celulozic	Biomasă lignocelulozică și deșeuri din biomasă	Hidroliza avansată și fermentație
Biogaz SNG (Gaz Natural Sintetic)	Biomasă lignocelulozică și deșeuri de natură lignocelulozică	Piroliză/Gazificare
Biodiesel	Biomasă lignocelulozică și deșeuri de natură lignocelulozică	Piroliză/Gazificare și sinteză
Biohidrogen Alți biocombustibili Biometanol, alcooli superiori, biodimetileter	Biomasă lignocelulozică și deșeuri din biomasă Biomasă lignocelulozică și deșeuri de natură lignocelulozică	Gazificare și sinteză/ Proces biologic Gazificare și sinteză

Etapa 1. Termen scurt (până în 2010)

- Îmbunătățirea tehnologiilor existente
- Cercetarea și dezvoltarea biocombustibililor de generația a doua (din biomasa lignocelulozică);
- Conceptul de biorafinare;
- Primele instalații demonstrative de producere a biocombustibililor de generația a doua.

Etapa 2. Termen mediu (2010 – 2020)

- Producerea de biocombustibili de generația a doua;
- Instalații demonstrative ce privesc conceptul de biorafinare integrată;
- Continuarea de cercetări spre îmbunătățirea tehnologiilor de producere a biocombustibililor de generația a doua și a biorafinării integrate;
- Dezvoltarea de opțiuni pentru culturile energetice și agricultură durabilă.

Etapa 3. Termen lung (după 2020)

- Producerea la scară largă a biocombustibililor de generația a doua;
- Dezvoltarea complexelor a biorafinării integrate.

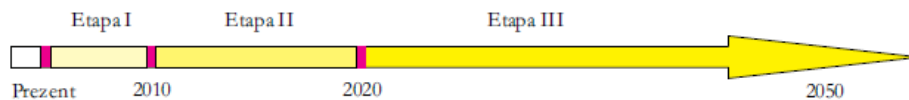


Figura I.3. Foaia de parcurs în domeniul biocarburanților lichizi [4].

Evaluarea oportunităților comerciale:

- ✓ Evaluarea avantajelor și dezavantajelor și a implicațiilor legale în cazul promovării unui nomenclator special pentru biocombustibili;
- ✓ Menținerea condițiilor de acces pe piața UE a importurilor de bioetanol;
- ✓ Propunerea de amendamente la standardul UE referitor la biodiesel, pentru a permite lărgirea gamei de uleiuri ce pot fi utilizate în producerea de biodiesel [4].

I.4. Bioetanolul celulozic

Etanolul celulozic este obținut din lignoceluloză, materialul structural principal pentru marea majoritate a plantelor. Este identic din punct de vedere chimic cu etanolul obținut din alte surse cum ar fi porumbul sau materialele amidonoase (porumb, zaharoză), biomasa incluzând deșeuri urbane, agricole și forestiere (tulpinile de porumb, diverse tipuri de iarbă (miscanthus, panicum), resturi de lemn (crengi căzute, așchii)). Prezintă avantajul că lignoceluloza este mult mai abundentă și poate proveni din mai multe surse. Diferă de celelalte prin faptul că necesită încă o etapă de procesare numită *celuloliză* - ruperea lanțurilor de celuloză cu formare de zaharuri.

I.4.1. Biomasa lignocelulozică

Biomasa lignocelulozică reprezintă o sursă, practic nelimitată și extrem de avantajoasă, de zaharide: celuloză și hemiceluloză. Din materialele lignocelulozice se obține etanol prin celuloliză (hidroliză și fermentare) sau prin intermediul unor procedee chimice: gazeificare și fermentare sau reacție catalitică (Figura I.4) [2],[5],[6],[7]. Biomasa constituie materia primă pentru producția la scară largă a biocombustibililor ecologici sau a altor compuși chimici. Reziduurile din agricultură (tulpini de porumb, grâu), silvicultură (rumeguș, așchii), deșeurile municipale (hârtie, carton), diversele deșeuri industriale, precum și plantele fibroase și lemnoase constituie o sursă abundentă și ieftină de lignoceluloză [3],[6].

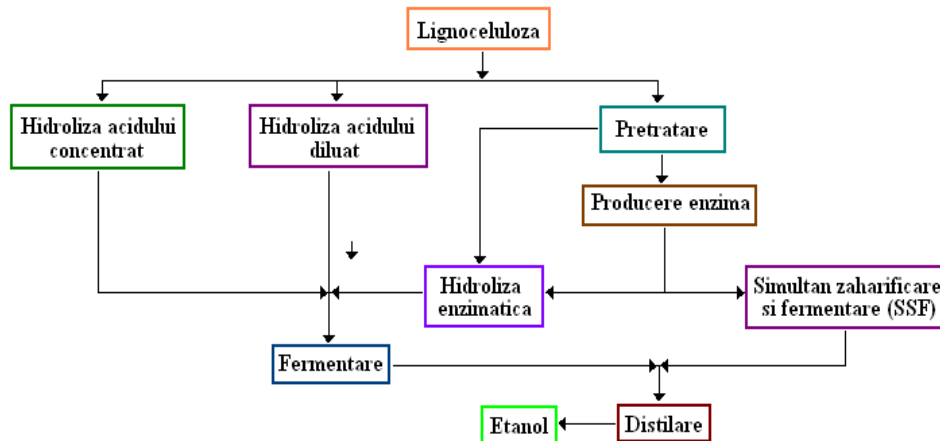


Figura I.4. Procesul de obținere a bioetanolului din biomasă lignocelulozică [7]

Biomasa lignocelulozică conține celuloză, hemiceluloză și lignină (Figura I.5). Celuloza este un homopolimer liniar, cristalin, format din unități repetitive de glucoză unite între ele prin legături β -glicozidice. Structura este una rigidă și deci este necesar un tratament dur pentru a o desface. Hemiceluloza este constituită din catene scurte, liniare și ramificate de zaharuri. Spre deosebire de celuloză, care este un polimer format numai din glucoză, hemiceluloza este un heteropolimer format din D-xiloză, D-glucoză, D-galactoză, D-manoză și L-arabinoză.

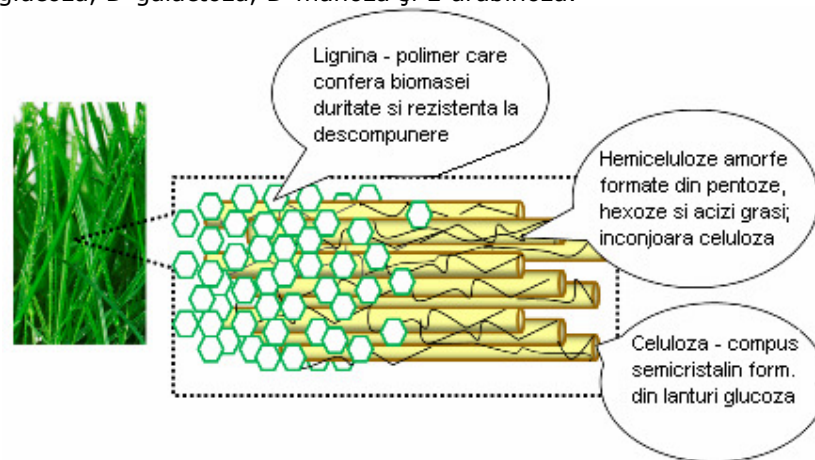


Figura I.5. Biomasa lignocelulozică [8]

În tabelul următor se arată compoziția unor reziduuri agricole, materiale lemnoase, deșeuri de legume și fructe precum și deșeuri solide municipale și producția de etanol corespunzătoare. Producția de etanol a fost estimată în funcție de proporția de hexozani (glucani, galactani, manani) și pentozani (xilan, arabinan) din fiecare sursă de biomasă (Tabelul I.3.) [8].

Tabelul I.3. Compoziția chimică a materiilor prime și producția de etanol corespunzătoare [8]

Materia primă	Celuloză/ Hexozani (H)	Hemiceluloză /Pentozani (P)	Lignină	Randamentul în etanol/kg masă uscată
Deșeuri de la prelucarea trestiei de zahăr	33 (H)	30 (P)	29	0.279
Paie de grâu	30 (H)	24 (P)	18	0.239
Paie de sorg	33 (H)	18 (P)	15	0.240
Paie de orez	32 (H)	24 (P)	13	0.248
Paie de ovăz	41 (H)	16 (P)	11	0.252
Știulete de porumb	42 (H)	39 (P)	14	0.358
Lujer de porumb	35 (H)	15 (P)	19	0.221
Lujer de orz	40 (H)	20 (P)	15	0.265
Coji de nucă măcinată	38 (H)	36 (P)	16	0.327
Lucernă	48.5	6.5	16.6	0.209
Coji de la orez	36 (H)	15 (P)	19	0.265
<i>Eucalyptus grandis</i>	38	13	37	0.225
<i>Eucalyptus saligna</i>	45	12.0	25.0	0.252
Pin	44.0	26.0	29.0	0.310
Plop	47.6	27.4	19.2	0.332
Rumeguș	55.0	14.0	21.0	0.305
Salcie	37.0	23.0	21.0	0.265
Plop tremurător	51	29.0	16.0	0.354
Molid	43.0	26.0	29.0	
Mesteacăn	40.0	23.0	21.0	0.305
<i>Lantana camara</i>	42.50	22.70	22.88	0.288
<i>Prosopis juliflora</i>	45.5	20.38	24.65	0.291
<i>Saccharum spontaneum</i>	45.10	22.70	24.56	0.300
<i>Eicchornia crassipis</i>	18.2	48.7	3.50	0.296
<i>Paja brava</i>	32.2	28.1	24.0	0.267
Ziar	61	16	21	0.341
Hârtie prelucrată	47	25	12	0.318
Deșeuri solide municipale	43	13	6	0.248

I.4.2. Structura biomasei

Biomasa lignocelulozei este alcătuită din trei compuși principali: *celuloza* (40-50%), *hemiceluloza* (25-35%), *lignina* (15-20%) și cantități mici de proteine, lipide (ceruri, uleiuri), acizi, săruri minerale [2], [9]. În tabelul I.4. este prezentată compoziția principalelor reziduuri din agricultură sau silvicultură utilizate la obținerea etanolului [2].

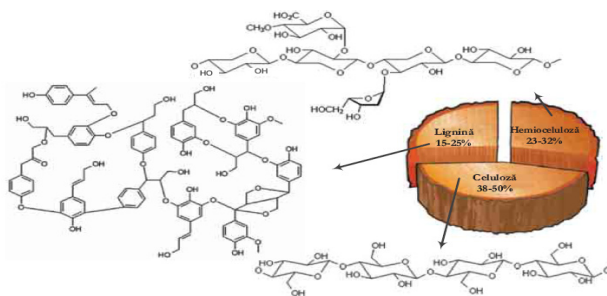


Figura I.6. Componentele principale ale biomasei lignocelulozice [9]

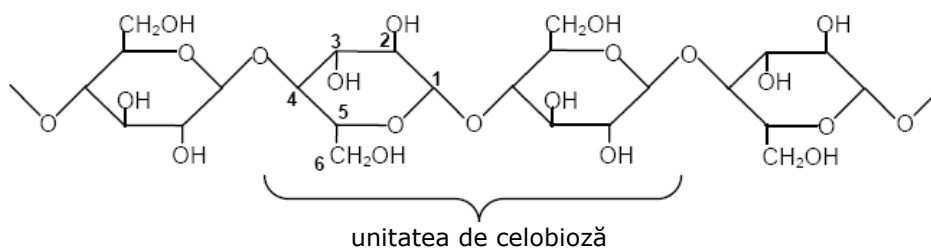
Tabelul I.4. Compoziția principalelor reziduuri agricole utilizate la obținerea etanolului [5].

Materialul lignocelulozic	Celuloză (%)	Hemiceluloză (%)	Lignină (%)
Lemn de esența tare	40-55	24-40	18-25
Lemn de esența moale	45-50	25-35	25-35
Paie de porumb	45	35	15
Paie de orez	32,1	24	18
Deșeuri din trestie de zahăr	33,4	30	18,9
Paie de grâu	30	50	15
Frunze	15-20	80-85	0
Ierburi (Switchgrass)	45	31,4	12

Se constată că celuloza și hemiceluloza reprezintă aproximativ două treimi din masa uscată a biomasei. Lignina nu poate fi utilizată pentru obținerea etanolului. Se cunosc însă câteva microorganisme care pot degrada lignina în produse valoroase: acizi organici, fenoli, vanilina. Prin intermediul unor procedee chimice, din lignină se pot obține diverși combustibili, determinând astfel creșterea competitivității procedului de obținere a etanolului [5].

Costul producției de etanol depinde foarte mult de compoziția biomasei. Utilizarea materialelor lignocelulozice perene este extrem de avantajoasă, deoarece sunt ieftine, au un impact redus asupra mediului înconjurător și se obțin cu randamente foarte bune chiar și pe terenuri de calitate scăzută [7].

Celuloza este componentul majoritar al structurii pereților celulari ai plantelor și reprezintă peste 50% din masa lemnului uscat [2], [6]. Molecula de celuloză este un polimer liniar, cu lanț filiform lung, constituit din peste 3000 unități de Δ -glucopiranoză unite prin legături β -1-4 glucozidice (figura I.7.) [6]. Grupele funcționale din lanțul celulozei sunt grupele hidroxil. În funcție de gradul legăturilor de hidrogen din și dintre moleculele de celuloză, această polizaharidă poate să aibă o structură cristalină sau amorfă. Celuloza se află în matricea formată de hemiceluloză și lignină. Este foarte rezistentă la degradare sau la depolimerizare de către acizi, enzime sau microorganisme [10].

**Figura I.7.** Reprezentarea schematică a lanțului de celuloză [6]

Hemiceluloza este un polimer cu lanț ramificat, mai scurt, de aproximativ 200 unități de zaharide cu 5 și 6 atomi de carbon (glucoză și alte zaharide: xiloză, manoză, galactoză, ramnoză și arabinoză) [2], [3]. Hemiceluloza prezintă o catenă principală formată din unități de xilan unite prin legături β -1,4 glucozidice și

numeroase catene ramificate de manoză, arabinoză, galactoză, acid glucuronic, etc. (figura I.8) [9].

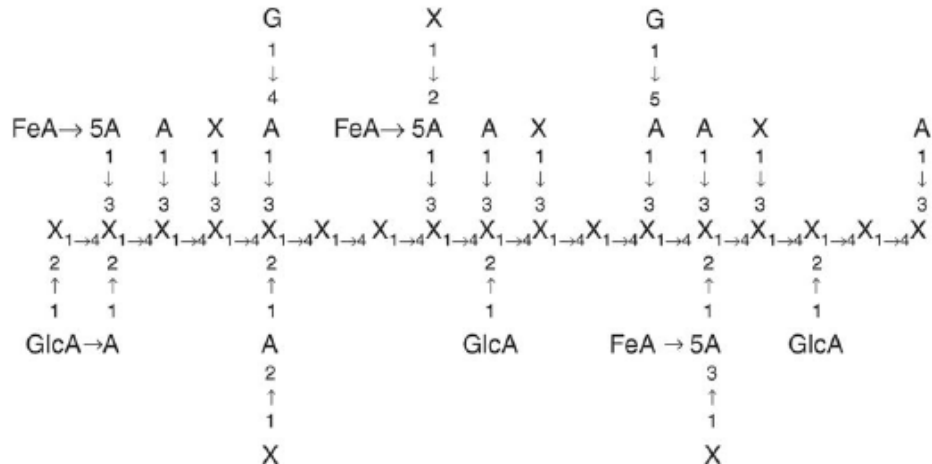


Figura I.8. Structura schematică a hemicelulozei (A-arabinoză; FeA-acid ferulic; G-galactoză; Glc-acid glucuronic; X-xiloză) [9]

Gradul de ramificare și natura zaharidelor aflate în cantitate mică în hemiceluloză variază în funcție de tipul plantei [9].

Lignina este un polimer aromatic, rigid, foarte complex, cu o structură foarte reticulată, tridimensională, alcătuit din peste 10.000 de unități de monolignoli, polifenilpropenă (*p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) și siringal (S) proveniți din alcool *p*-cumarilic, alcool coniferilic și alcool sinapilic) (figura I.9.) [2], [3], [11].

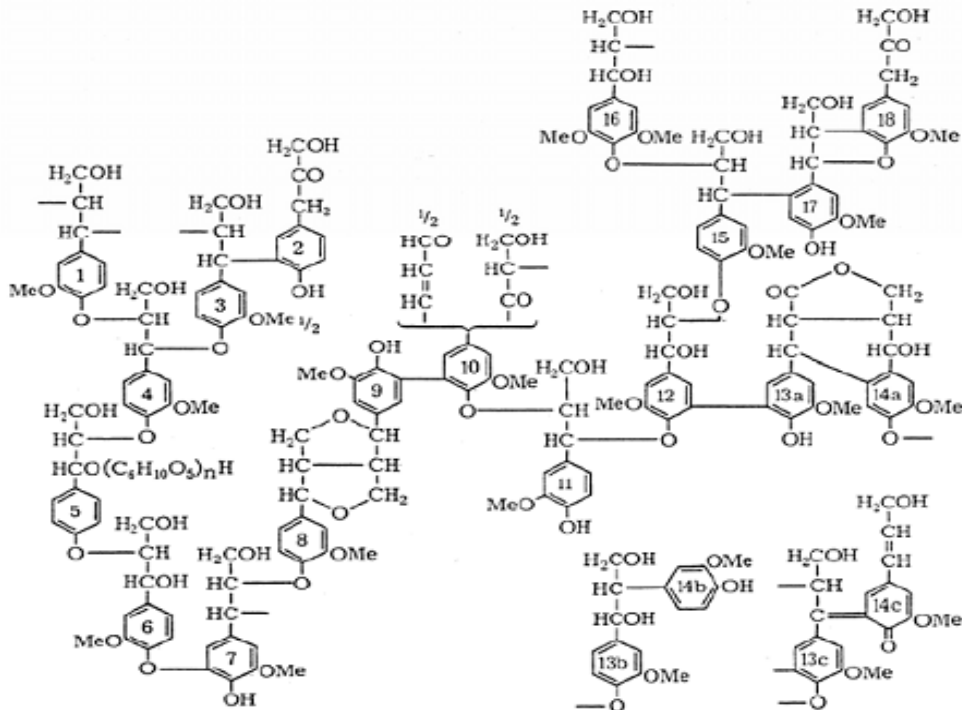


Figura I.9. Compoziția ligninei [9]

Structura complexă și compactă a lignocelulozei îngreunează degradarea enzimatică a zaharidelor fermentabile. Se cunosc doar câteva microorganisme care pot degrada lignina în produse valoroase: acizi organici, fenoli, vanilină. Din acest motiv, prețul etanolului lignocelulozic este mult mai mare comparativ cu alcoolul provenit din materiile amidonoase sau zaharoase. Eficiența și costul enzimelor influențează competitivitatea bioetanoului obținut. În plus, eficiența fermentării este afectată de prezența pentozelor a căror conversie în etanol este mai puțin eficientă comparativ cu cea a hexozelor [9].

Prin intermediul unor procedee chimice, din lignină se pot obține diverși combustibili, determinând astfel creșterea competitivității procedurii de obținere a etanolului [6], materialele lignocelulozice putând servi drept materii prime, în numeroase procese biotehnologice, pentru obținerea de combustibili, diverși compuși chimici utili (acid lactic, hidrogen) [12].

Costul producției de etanol depinde foarte mult de compoziția biomasei. În tabelul I.5 este prezentată compoziția chimică pentru câteva materiale lignocelulozice. Utilizarea materialelor lignocelulozice perene este extrem de avantajoasă, deoarece sunt ieftine, au un impact redus asupra mediului înconjurător și se obțin cu randamente foarte bune [7], [13].

Tabelul I.5. Compoziția biomasei lignocelulozice (% masă uscată)[7]

Materie primă	Lemn de esență tare			Lemn de esență moale	Ierburi
	Salcâm negru	Plop hibrid	Eucalipt	Pin	Switchgrass
Celuloză	41,61	44,70	49,50	44,55	31,98
Glucan 6C	41,61	44,70	49,50	44,55	31,98
Hemiceluloză	17,66	18,55	13,07	21,90	25,19
Xilan 5C	13,86	14,56	10,73	6,30	21,09
Arabinoză 5C	0,94	0,82	0,31	1,60	2,84
Galactan 6C	0,93	0,97	0,76	2,56	0,95
Manan 6C	1,92	2,20	1,27	11,43	0,30
Lignină	26,70	26,44	27,71	27,67	18,13
Cenușă	2,15	1,71	1,26	0,32	5,95
Acizi	4,57	1,48	4,19	2,67	1,21
Extractive	7,31	7,12	4,27	2,88	17,54
Val. calorică (GJ _{HHV} /tonă uscat)	19,5	19,6	19,5	19,6	18,6

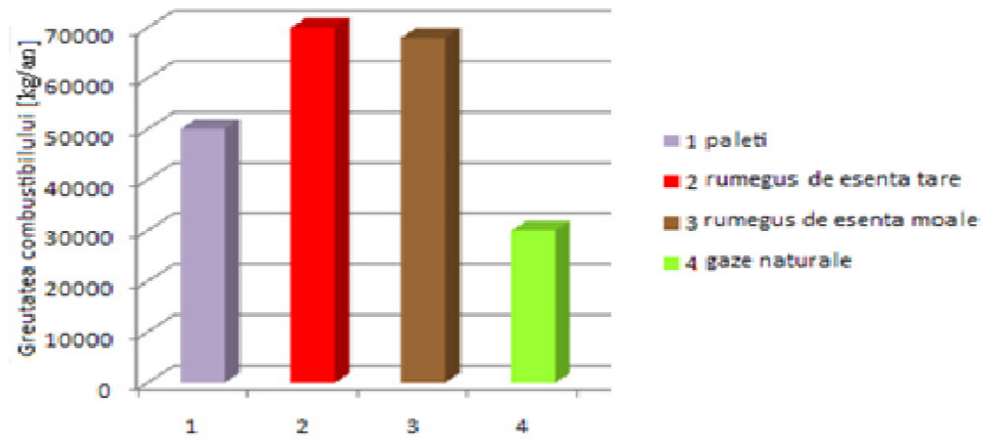
I.4.3. Caracterizarea biomasei lignocelulozice

Biomasa lignocelulozică se caracterizează prin :

Densitatea biomasei lemnoase variază între 0,30-0,90g/cm³. În funcție de densitatea substratului lignocelulozic, aceasta se clasifică în:

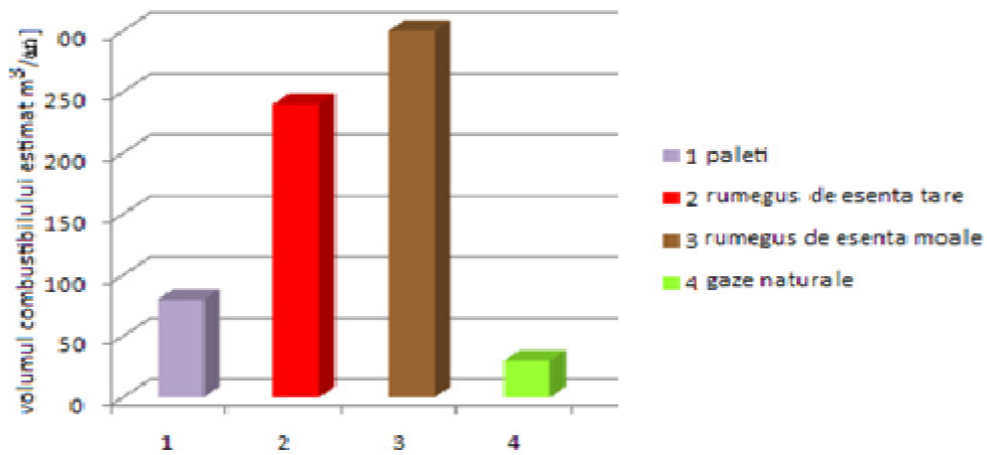
- lemn foarte greu cu densitatea mai mare de 0,80g/cm³(*stejar*);
- lemn greu cu densitatea între 0,71-0,80 g/cm³ (*carpen, salcam*);
- lemn semigreu cu densitatea între 0,61-0,70 g/cm³ (*frasin, paltin, mesteacăn*);
- lemn semiușor cu densitatea între 0,51-0,60 g/cm³ (*nuc, castan*);
- lemn ușor cu densitatea între 0,41-0,50 g/cm³ (*brad, molid*);
- lemn foarte ușor cu densitatea sub 0,41 g/cm³ (*plop, salcie*).

O altă caracteristică este greutatea specifică fiecărui tip de biomasă. În figura I.10. este reprezentată greutatea estimată a diferitelor tipuri de combustibili.

Greutatea combustibilului**Figura I.10.** Greutatea estimată a combustibilului[3]

Se poate observa că rumegușul provenit din lemnul de esență tare are cea mai mare greutate, comparativ cu celelalte tipuri de combustibili considerate (paletți, gaze naturale, uleiuri).

În schimb, volumul de rumeguș din lemnul de esență moale care este mult mai mare comparativ cu proporția celorlalte tipuri de biomasă (figura I.11).

Volumul combustibilului**Figura I.11.** Volumul combustibilului estimat [3]

Cantitatea de cenușă

Cenușa reprezintă reziduu anorganic rezutat în urma descompunerii componentelor majoritari, în special lignina. În componența acestui reziduu se regăesc și poluanții din sol, rămași după îndepărtarea apei și a materiei organice la temperatura de 575 (+/- 25)°C, în prezența unor agenți oxidanți. Caracterizarea cenușei (analiza elementară, etc) este importantă în procesul de selecție a materiei prime utilizate pentru obținerea biocombustibililor.

Determinarea conținutului de cenușă se face cu ajutorul relației următoare:

$$\text{Cenușa (\%)} = \frac{\text{masa uscată}}{\text{masa în totală a biomasei uscate la etuvă}} \quad (1)$$

Cantitatea de cenușă, rezultată prin arderea diferitelor tipuri de biomasă, conform estimărilor făcute, provine, în cea mai mare măsură, din rumeguș și paletți (figura I.12 și I.13).

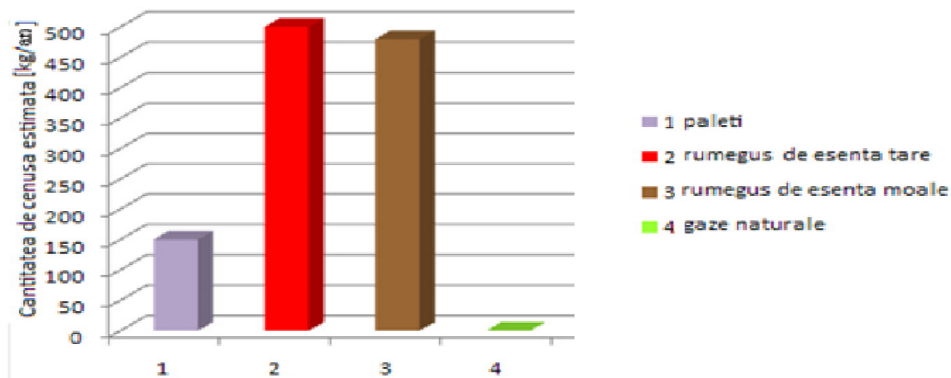


Figura I.12. Cantitatea de cenușă estimată [3]

Volumul de cenușă

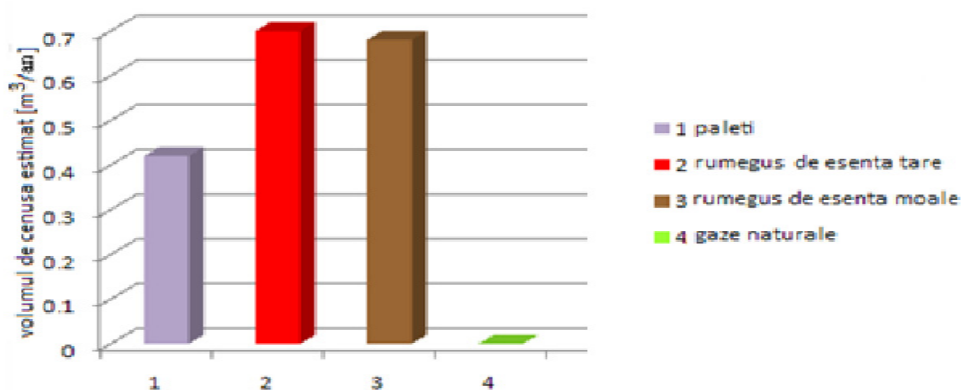


Figura I.13. Volumul de cenușă estimat [3]

Utilizarea materialelor lignicelulozice perene este extrem de avantajoasă, deoarece sunt ieftine, au un impact redus asupra mediului înconjurător și se obțin cu randamente foarte bune chiar și pe terenuri de calitate scăzută, neincluse în circuitul agricol.

I.5. Metode de obținere

Există *trei metode* principale pentru obținerea biocombustibililor:

I. Arderea resturilor organice: deșeuri menajere, industriale sau a celor provenite din agricultură, paie, lemn și turbă;

II. Procese de fermentație

- fermentația deșeurilor umede (dejecții provenite de la animale) în condiții anaerobe pentru producerea biogazului cu un conținut de metan de peste 60%;
- fermentația trestiei de zahăr sau a porumbului pentru obținerea alcoolului sau a esterilor;

III. Energia forestieră utilizează drept combustibili copacii.

Sinteza acestor biocombustibili ecologici prezintă câteva dezavantaje:

- producția trebuie să asigure cantități mari de biocombustibili ieftini;
- în procesul de fabricație a biocombustibililor se emit gaze cu efect de seră; sursa acestor emisii sunt: îngrășămintele folosite în agricultură, transportul biomasei, a biocombustibililor;
- creșterea producției de biocombustibili, cu excepția biocombustibililor din generația a doua, determină o creștere a ariilor cultivate;
- biodieselul și ceilalți biocombustibili poluează atmosfera prin emisiile de oxizi de azot, principala cauză a smogului [2], [6].

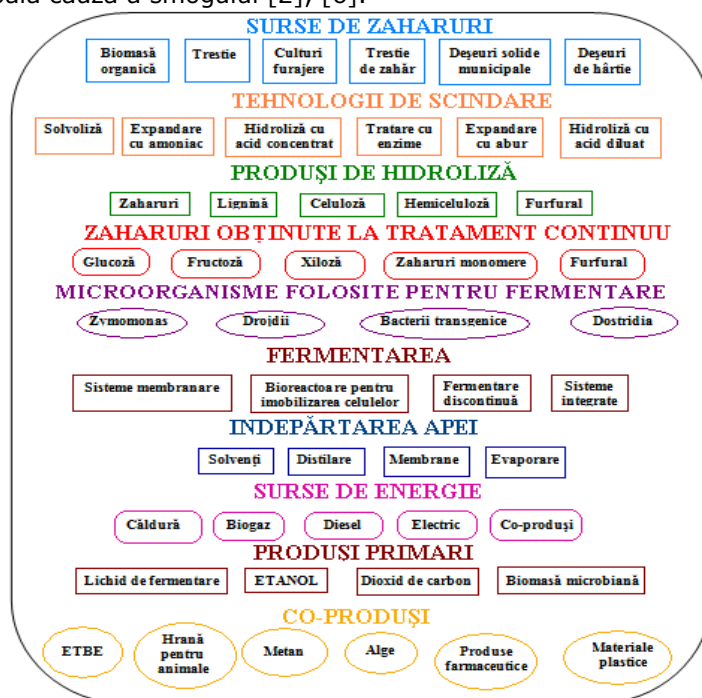


Figura I.14. Principalele procedee de transformare a biomasei în etanol[6]

24 Capitol I - Stadiul cunoașterii în domeniu

Pentru obținerea etanolului din materiale lignocelulozice se cunosc cel puțin două metode de preparare:

- *Celuloliza*: procedeu care constă din hidroliza materialelor lignocelulozice pretratate, urmată de fermentare și distilare [2];
- *Gazificarea*: metoda prin care lignoceluloza este transformată în monoxid de carbon și hidrogen, prin fermentare sau prin cataliză termochimică (proces Fischer-Tropsch), gaze care apoi pot fi convertite la etanol [6], [7], [11], [14].

Avantaje - prin oricare dintre cele două metode de obținere a etanolului celulozic nu se generează emisii toxice, iar utilizarea etanolului celulozic drept combustibil conduce la o diminuare a emisiilor de gaze cu efect de seră cu aproximativ 80%, comparativ cu situația în care s-ar folosi benzină.

Dezavantajul major este reprezentat de costurile mult mai ridicate pe care le impune sinteza etanolului celulozic, comparativ cu prepararea etanolului din zaharoză. Aceasta se datorează faptului că cea mai mare parte a studiilor efectuate au la bază procese enzimatică, care conduc la sinteza etanolului celulozic în concentrații scăzute [2].

Caracteristicile structurale ale lignocelulozei influențează hidroliza polizaharidelor [15], [16]. Scindarea biomasei lignocelulozice este mult mai dificilă, comparativ cu hidroliza substraturilor non-celulozice, care se realizează, cu ușurință, la temperaturi ridicate, în mediu acid [17]. Procesele tehnologice de obținere a etanolului celulozic diferă, în funcție de metodele folosite pentru hidroliză și fermentare [2],[18], [19].

Scindarea materialelor lignocelulozice se realizează prin hidroliză acidă sau enzimatică. Forma cristalină a celulozei împiedică intrarea acidului în interiorul microfibrilor și de aceea hidroliza este mult mai dificilă, materia primă necesitând un pretratament adecvat. În plus, hidrolizatul lichid de biomasă rezultat în urma pretratamentului trebuie neutralizat și condiționat pentru a îndepărta sau inactiva acei compuși, fie puși în libertate din materia primă (ca acid acetic sau lignină), fie formați prin degradarea biomasei (de exemplu furfural), care pot avea efect inhibitor în timpul fermentației [2], [20], [21], [22].

Se consideră că principalii factori care influențează hidroliza lignocelulozei sunt *lignina*, care restricționează hidroliza enzimatică, și *structura cristalină a celulozei* care inhibă accesul acidului în interiorul microfibrilor de celuloză [2], [15].

Principalele monozaharide prezente în majoritatea materialelor lignocelulozice (orez, paie de grâu, deșeuri de la sfecla de zahăr, porumb, lemn de esență tare și moale, ierburi) sunt Δ -glucoza și Δ -xiloza. În lemnul de esență moale se găsesc și cantități semnificative de manoză [2], [23]. Se cunosc mai multe variante de celuloliză: hidroliza cu acid diluat, în prezență de diverși catalizatori: hidrogen, fluoruri, acid sulfuric, acid azotic și acid clorhidric, hidroliza enzimatică [2], [24].

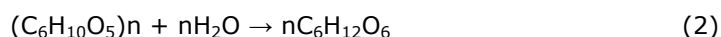
Eficiența procesului de zaharificare depinde de mai mulți factori: natura materiei prime, caracteristici, condiții de hidroliză, tipul și amestecul de enzime utilizate, metoda de pretratare. Pentru o scindare eficientă în monozaharidele constituente, este necesară optimizarea condițiilor de pretratare și hidroliză.

S-a constatat că, procesele de hidroliză acidă sunt mult mai eficiente în cazul în care se folosește lemnul, iar metodele enzimatică se pot aplica pentru

lemnul de esență tare și plantele ierboase. Un alt procedeu pentru prepararea etanolului este gazeificarea biomasei [2], [18].

I.5.1 Metoda celulolitică (calea biologică)

Celuloza și hemiceluloza, fiind polizaharide, pot fi scindate în zaharide fermentabile. Lignina, neavând în compoziția sa zaharide, nu poate fi utilizată la prepararea etanolului.



Porțiunile celulozice și hemicelulozice din biomasă sunt procesate separat, datorită structurii și conținutului lor diferit. Datorită structurii sale amorfe, hemiceluloza poate fi ușor hidrolizată în prezență de acizi diluați sau baze, sau sub acțiunea unui număr mare de enzime. Separarea acestor polimeri complecși din structura zaharidelor fermentabile este esențială pentru asigurarea eficienței economice a producției de etanol celulozic [2], [5].

Această metodă cuprinde cinci etape:

1. Pretratarea, pentru a facilita hidroliza materialului lignocelulozic, cum sunt de exemplu lemnul sau paie;
2. Hidroliza celulozei (celuloliza), pentru a desface moleculele de celuloză în zaharuri fermentescibile;
3. Separarea soluției de zahăr din materialul rezidual (lignina);
4. Fermentarea microbiană a soluției de zahăr;
5. Distilarea (pentru a obține alcool de puritate 99.5%), [2], [25], [26].

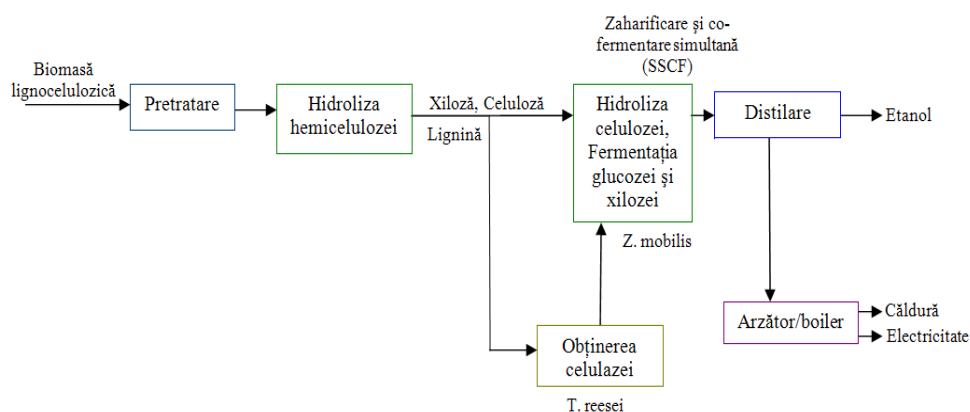


Figura I.15. Reprezentarea schematică a metodei celulolitice [25]

CAPITOLUL II

Metode de pretratare a lignocelulozei

Utilizarea biomasei celulozice fără o etapă de pretratare prealabilă conduce la un randament global de biocombustibil de aproximativ 20%, comparativ cu randamentul de aproximativ 90% obținut în cazul în care se utilizează o etapă de pretratare [7].

Etapa de pretratare a fost introdusă pentru fracționarea biomasei lignocelulozice în biopolimerii constituenți și pentru a facilita atacul enzimatic. Etapa de pretratare trebuie să permită recuperarea cu ușurință a ligninei și a altor constituenți nefermentabili, în vederea utilizării lor ulterioare pentru sinteza altor compuși chimici utili [2], [6].

Prima etapă în bioconversia lignocelulozei la bioetanol este reducerea mărimii și pretratamentul. Scopul acestei etape este de a distruge sau îndepărta piedicile structurale și de compoziție ce pot fi implicate în procesul de hidroliză, precum și de a îmbunătăți viteza de hidroliză a enzimelor și de a mări randamentul de obținere a zaharurilor fermentabile din celuloză sau hemiceluloză [27]. Pretratamentul alterează structura celulozică a biomasei pentru a facilita accesul enzimei (celulazelor) la conversia carbohidraților polimeri în zaharuri fermentabile. [2], [28].

În etapa de pretratament trebuie să se urmărească atingerea următoarelor cerințe: [29]

- îmbunătățirea formării zaharurilor sau a abilității obținerii ulterioare a zaharurilor prin hidroliză;
- evitarea degradării sau pierderii carbohidraților;
- evitarea formării subprodusilor ce pot inhiba hidroliza ulterioară și procesele de fermentare;
- eficiența costurilor [30].

S-au investigat și alte metode de pretratament mai ieftine dar totuși efective. Studii recente efectuate în scopul dezvoltării procesului de pretratament au fost bazate pe cunoștințe referitoare la modificările structurale ale biomasei. Lignina dizolvată în anumite condiții ale pretratamentului se poate aparent redepozita în celuloză, creând o barieră pentru hidroliza efectivă a celulozei și reducând randamentul în zahar. Pentru alegerea procedurii de pretratare optim s-au realizat inclusiv studii privind distribuția ligninei în structura biomasei prin tehnica microscopiei electronice de baleaj (SEM) [2].

Prin *metode chimice, fizice sau biologice*, are loc solubilizarea totală sau parțială a ligninei și hemicelulozei [6], [7], [9], [27]. Pretratarea prin metode chimice, în prezența acizilor diluați, prezintă dezavantajul că zaharidele hemicelulozice se pot descompune în furani și fenoli, compuși care inhibă procesul de fermentare, diminuând în acest fel randamentul etanolului [7], [28].

În etapa de pretratare are loc, practic, hidroliza hemicelulozei într-un amestec de pentoze (xiloză și arabinoză) și hexoze (manoză și galactoză) și a unei mici cantități din celuloză în glucoză [6]. Produsul este filtrat și presat, solidul rezultat (celuloza și lignina) este supus hidrolizei, iar soluția, alcătuită din zaharide

este introdusă în fermentatoare [7]. Nu se poate stabili o anumită metodă pentru pretraterea biomasei, întrucât aceasta provine din diferite surse: plante ierboase sau lemnoase, deșeuri municipale, reziduuri provenite din agricultură sau industrie.

II. 1. Metode fizice de pretratere a biomasei lignocelulozice

Metode fizice includ presiune, tocare, mărunțire, măcinare, agitare, compresie, expandare sau alte tipuri de procedee mecanice.

II.1.1. Pretraterea mecanică

Metodele de pretratere includ tratamente mecanice și fizice pentru curățarea, mărunțirea biomasei și distrugerea structurii celulare, pentru a facilita tratamentele chimice și biologice ulterioare.

Pentru fiecare materie primă este necesară o anumită metodă de pretratere pentru a minimaliza degradarea substratului și îmbunătățirea randamentului zaharidelor [2], [7].

Mărunțirea biomasei facilitează accesul enzimelor, aburilor. Energia consumată pentru reducerea dimensiunii particulelor reprezintă aproximativ 30% din consumul energetic total al procesului. Extractivele se pot îndepărta cu aburi (~160°C) [7].

II.1.2. Expandarea cu aburi

Este una din cele mai avantajoase metode de pretratere a biomasei. Poate fi considerată o alternativă a metodelor chimice sau mecanice de pretratere a biomasei. Se lucrează la temperaturi și presiuni ridicate, în incinte etanșe [27]. Materialul lignocelulozic este încălzit, timp de câteva minute, cu ajutorul aburilor la presiune (20-50 bar, 210-290°C). După un interval de 1-5 minute, prin decompresie la presiune atmosferică, se formează aburi, care determină expandarea materialului lignocelulozic [2], [7].

Expandarea cu aburi nu este foarte eficientă în cazul lemnului de esență moale. Una din explicații ar fi condensarea ligninei. Introducerea unui catalizator are efecte favorabile asupra îndepărtării și hidrolizei hemicelulozei [2].

II.1.3. Tratarea cu apă fierbinte (LHW)

Folosește apă fierbinte, la presiune, pentru hidrolizarea hemicelulozei. Principalele avantaje sunt:

- randamentul mare de recuperare a xilozei (88-98%),
- nu se folosesc acizi sau catalizatori chimici,
- nu rezultă deșeuri.

Aceasta metoda de pretratere a biomasei lignocelulozice se aplică, deocamdată, doar în laborator [2].

II.2. Metode chimice de pretratare a biomasei lignocelulozice

Metodele chimice (cu acizi diluați, medii alcaline, amoniac, solvent organic, dioxid de sulf, dioxid de carbon, etc.) sunt cele mai utilizate, însă din considerente economice și de protecția mediului se preconizează că acestea vor fi înlocuite de metodele fizice. Alegerea tipului etapei de pretratare influențează randamentul de etanol [2].

Biomasa brută fiind extrem de inertă la scindarea enzimatică, au apărut și s-au dezvoltat o serie de metode de pretratare termochimică. Studiile efectuate au demonstrat că există o corelație directă între îndepărtarea ligninei și hemicelulozei și creșterea randamentului hidrolizei.

Metodele chimice de pretratare implică scindarea fibrelor în condiții variate, de la medii foarte acide la medii alcaline. În aceste condiții, pot fi afectați diferiți constituenți ai biomasei. De exemplu, pretratarea acidă determină hidroliza hemicelulozei, iar fracțiile de celuloză și lignină rămân intacte în reziduu solid. În cele mai multe cazuri se lucrează cu H_2SO_4 . Pretratarea în mediu alcalin afectează doar lignina [2], [9].

II.2.1. Hidroliza acidă

A fost folosită mult timp, însă are efecte negative asupra mediului înconjurător, prin depozitarea deșeurilor de gips. Se poate folosi acid sulfuric, clorhidric sau acid azotic. În general, etapa de hidroliză chimică a biomasei lignocelulozice are loc printr-un atac acid. Procesele de hidroliză acidă au la bază două procedee: *Belgius-Rheinau* și *Scholler-Tornesch*, care au apărut în timpul celui de al doilea război mondial [29]. Se poate realiza cu acid diluat sau cu acid concentrat.

II.2.1.1. Hidroliza cu acid diluat

Dintre toate aceste metode chimice de pretratare, metoda cu acidul sulfuric diluat (0,5-1,5%) la temperatură ridicată (180÷240°C) are cele mai multe aplicații industriale, deoarece se obțin randamente bune de zaharide din hemiceluloză (randamentul de xiloză este de aproximativ 75-90%) [7].

Acidul trebuie să fie îndepărtat/neutralizat înainte de fermentare. Se formează cantități mari de gips. Timpul de reacție este relativ scurt. Pretratarea materialului lignocelulozic cu acid diluat poate avea loc în două etape. Într-o primă etapă are loc depolimerizarea hemicelulozei la xiloză și alte zaharide. Cantitatea mică de acid este suficientă pentru recuperarea chimică. Randamentul maxim de glucoză este de aproximativ 55%. Formarea produșilor de degradare în cantitate mare poate determina inhibarea fermentării.

Hidroliza cu acid diluat (acid sulfuric), prin *procedeul Scholler-Tornesch* se desfășoară la temperaturi și presiuni ridicate și are un timp de reacție mic (ordinul secundelor sau minutelor). Temperatura mare accelerează degradarea polizaharidelor, fiind posibilă, însă și degradarea monozaharidelor obținute. Pentozele se degradează mai repede decât hexozele. O creștere a randamentului este posibilă, în cazul în care hidroliza se desfășoară în reactoare de percolare cu amestecarea și colectarea, imediat după obținere, a monozaharidelor. Hidroliza se desfășoară în 10-12 etape consecutive, după care se modifică temperatura și scade

concentrația acidului. Modificările aduse procesului au permis reducerea timpului de reacție la 3-4 ore.

Realizarea hidrolizei în două etape reprezintă o altă variantă prin care se poate mări randamentul. Prima etapă are loc în condiții mai blânde, pentru recuperarea pentozelor, iar cea de-a doua etapă se desfășoară în condiții mai energice pentru a permite recuperarea hexozelor. Și în aceste condiții, persistă, însă, degradarea zaharidelor, iar randamentele sunt scăzute (aproximativ 272 litri etanol din o tonă lemn uscat). Viteza mare de reacție permite realizarea unui proces continuu și reprezintă avantajul major [2].

Dezavantajele acestor metode de hidroliză sunt date de necesitatea folosirii unor materiale speciale, scumpe, pentru construcția reactorului și eficiența de recuperare a zaharidelor de aproximativ 50%, datorită apariției unei reacții secundare, de degradare a glucidelor.

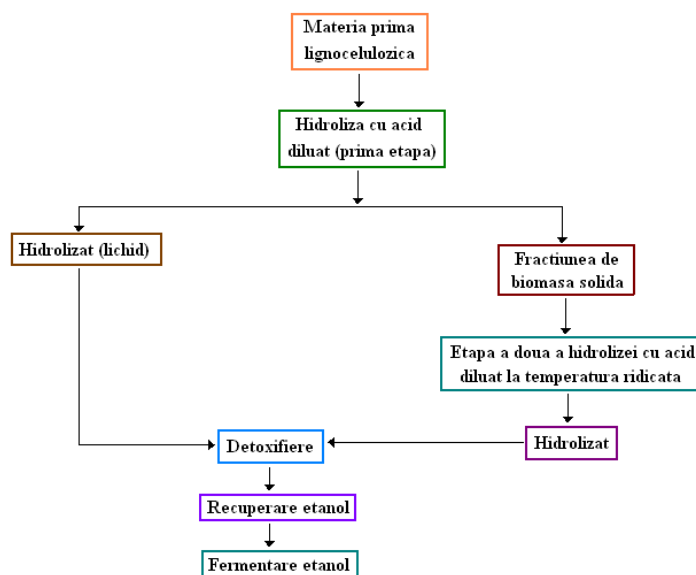


Figura II.1. Hidroliza cu acid diluat [7]

II.2.1.2. Hidroliza cu acid concentrat

Există mai multe variante de hidroliză cu acizi concentrați, însă acestea s-au dovedit a fi destul de costisitoare [7].

În metoda cu acid concentrat se lucrează cu H_2SO_4 (concentrație masică 72%) sau HCl (concentrație masică 42%), la temperatura camerei pentru dizolvarea celulozei, urmată de diluția cu acid 1% și încălzirea amestecului la 100 - 120°C timp de aproximativ 3 ore pentru a scinda oligomerii celulozici în monomeri de glucoză. Procedul permite obținerea glucozei cu randamente mari, însă prezintă câteva dezavantaje majore: reactoarele trebuie construite din materiale speciale, consumul de apă trebuie să fie minimalizat.

În *procedeul Belgius-Rheinau* se lucrează cu acid clorhidric concentrat, în condiții blânde de temperatură și presiune. În primă etapă, are loc o îndepărtare a hemicelulozei din lignoceluloză cu acid clorhidric de 35%. Etapa de hidroliză propriu-zisă se desfășoară în prezență de acid clorhidric mai concentrat. Hidrolizatul obținut este tratat cu acid diluat. Etapa de pretratare și hidroliza au loc la temperaturi scăzute, iar prelucrarea hidrolizatului se face cu acid diluat la temperaturi ridicate. Acidul este recuperat prin distilare azeotropă. Acest procedeu permite degradarea lentă a polizaharidelor. Procedeu prezintă o eficiență ridicată (peste 90%) și este mai ieftin, însă se desfășoară cu o viteză relativ scăzută. Metoda prezintă și alte dezavantaje legate de necesitatea recuperării sau neutralizării acidului din soluția de zaharide, utilizarea unor instalații speciale (anticorozive). O altă soluție ar putea fi separarea acidului concentrat prin diverse metode, de exemplu, separare cromatografică. Există instalații de acest fel în California și în Japonia (Bluefire Ethanol 2006).

Aceste metode necesită un consum crescut de enzime, prezența unor enzime care să scindeze atât hemiceluloza cât și celuloza. Pretratarea chimică determină formarea unor compuși nedorți. Astfel, prin hidroliza acidă se formează, în cantități relativ mari, în faza lichidă, a furfuralilor, care inhibă fermentarea. La hidroliza alcalină în hidrolizat, apar concentrații crescute de ferulați și acetati. Acești co-produși rămân în hidrolizat și afectează microorganismele fermentative [9].

Atunci când biomasa lignocelulozică este tratată cu un acid (acid sulfuric diluat), apar și produși de descompunere ai ligninei și zaharidelor. Dintre aceștia, cei mai toxici sunt furfuralul și hidroximetil furfuralul, care au efect inhibitor asupra etapelor ulterioare de hidroliză și fermentație a zaharidelor celulozice. Prezența acestor inhibitori implică apariția unor etape suplimentare („etape de detoxificare”), care influențează costul de producție [2], [6].

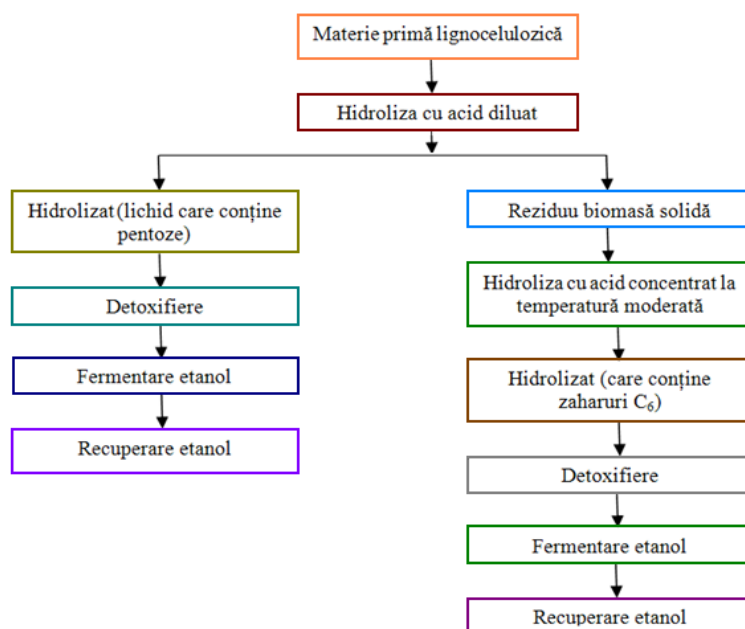


Figura II.2. Hidroliza cu acid concentrat [6]

II.2.2 Pretratare în mediu alcalin

Pentru pretratarea în mediu alcalin se folosesc baze de tipul hidroxid de sodiu sau hidroxid de calciu.

Întreaga cantitate de lignină și o parte din hemiceluloză este îndepărtată. Un avantaj este creșterea reactivității celulozei. Costurile pentru materiile prime sunt mult mai scăzute, comparativ cu hidroliza acidă. Însă, utilizarea unor concentrații mari de reactivi necesită tratarea apelor reziduale și creșterea costurilor pentru neutralizarea deșeurilor. Metodele alcaline de pretratare sunt, în general, mai eficiente, întrucât se solubilizează o mare parte din lignină, însă cea mai mare parte din hemiceluloză rămâne în stare insolubilă [7].

II.2.3. Pretratarea cu solvenți organici

Delignificarea lemnului se poate face în solvenți polari neapoși. Utilizarea procedurii cu solvenți prezintă unele avantaje comparativ cu metodele chimice tradiționale:

- poate folosi material lignocelulozic de dimensiuni mici, facilitând îndepărtarea impurităților;
- posibilitatea izolării și recuperării ligninei în formă nealterată;
- Recuperarea cu randamente bune a zaharidelor din hemiceluloză [27].

Metoda de pretratare a biomasei lignocelulozice în care se folosește ca și solvent etanolul se realizează scindarea chimică și solubilizarea fragmentelor de lignină. Biomasa lignocelulozică (așchii) se introduce în reactor împreună cu etanolul. Amestecul este încălzit și agitat pentru a se asigura o amestecare optimă. După răcire, materialul lignocelulozic fibros este recuperat și prelucrat ulterior pentru obținerea etanolului. Întrucât este vorba de același solvent și produs final (etanol), metoda prezintă avantajul că simplifică procesul tehnologic de obținere a bioetanolului (reduce numărul etapelor necesare) [2].

Atunci când materia primă este constituită din lemn de esență moale, se preferă pretratarea cu solvenți organici (etanol), întrucât prin expandarea cu aburi ar fi necesară o etapă suplimentară de delignificare. Prin folosirea etanolului drept solvent organic, se obține fracția celulozică care poate fi hidrolizată cu ușurință și lignină cu proprietăți reactive [27].

II.2.4. Pretratarea cu lichide ionice

II.2.4.1. Lichide ionice - generalități

Lichidele ionice (ILS) au atras interesul în ultimele decenii, cu o gamă diversificată de aplicații (Fig. II.3.). Tipurile de lichide ionice disponibile au fost de asemenea extinse pentru a include noi familii și generații de lichide ionice cu proprietăți mai specifice. Această curiozitate a condus la o serie de comentarii cu privire la proprietățile fizico-chimice, la proiectarea de noi familii de lichide ionice, la ingineria chimică și o gamă largă de modalități de utilizare a ILS (fază lichidă, multifazice, imobilizat pe suporturi) precum și la instalațiile pilot sau industriale.

Introducerea unor funcționalități structurale pe părțile cationice sau anionice a făcut posibilă proiectarea unor lichide ionice noi cu proprietăți specifice.

32 Capitolul II - Metode de pretratere a lignocelulozei

Mai recent, ILS par a fi obiectul unor publicații fundamentale care vizează îmbunătățirea înțelegerii acestor solvenți, estimarea proprietăților fizico-chimice și utilizarea lor în diverse aplicații cum ar fi senzorii, pilele de combustie, baterii, condensatoare, fluide termice, plastifianți, lubrifianți, geluri ionice, extractanți și solvenți în analiză, sinteză, cataliză și separare. ILS pot fi folosite mai mult decât doar ca un solvent ecologic alternativ. Aceștia diferă de solvenții moleculari prin caracterul lor ionic unic cât și prin structura și organizarea lor care poate conduce la efecte specifice. Unul dintre cuvintele cheie în ceea ce privește ILS este diversitatea. Diversitatea de combinații de anioni-cationi, diversitatea modului de preparare, modul de purificare și natura impurităților (calitatea), diversitatea de proprietăți, diversitatea modului de utilizare, diversitatea de aplicații. Acesta este unul dintre motivele pentru care este atât de dificil să se facă generalizări cu privire la proprietățile lor fizice sau utilizarea lor [31].

Lichidele ionice pot acționa ca solvenți, sub formă de compuși multifuncționali ca și solvenți sau liganzi, solvenți și catalizatori, agenți de stabilizare pentru catalizatori sau intermediari. Performanța unui lichid ionic va depinde puternic de tehnologia în care a fost implementat. Ele pot fi utilizate în moduri diferite: omogen, multifazic, heterogen, în biotransformări sau în organo-cataliză. Acestea joacă un rol specific în toate aceste abordări. Chiar mai mult decât diversitatea, un alt cuvânt cheie pentru utilizatorul final este predicția. În ultimele decenii au fost dezvoltate noi familii de ILS cu cationi diferiți. Ele sunt, în general, compuse din ioni asimetrici și flexibili, cu componente de dimensiuni și forme foarte diferite și implică diferite tipuri de interacțiuni dominante [31].

Având în vedere gama largă de lichide ionice și aplicațiile acestora, este dificil să se generalizeze proprietățile acestora și să se prezinte tendințele generale. Uneori, autorii subliniază diferențele lor și nu asemănările. Unele dintre proprietățile descrise în urmă cu câțiva ani sunt în prezent obiectul unor controverse, de exemplu: fereastra electrochimică; stabilitatea termică pe termen lung (stabilitatea termică a fost cu siguranță supraestimată în trecut); polaritatea; volatilitatea (unele lichide ionice sunt distilabile în anumite condiții).

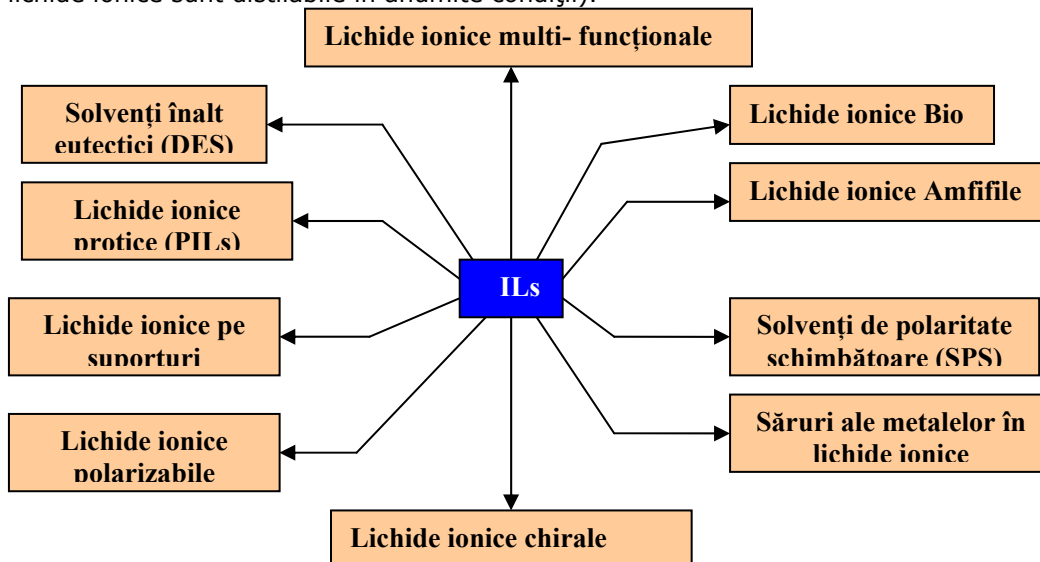


Figura II.3. Evoluția generațiilor de lichide ionice [31]

II.2.4.2. Pretratarea materialului lignocelulozic cu lichide ionice

În ultimii ani s-au utilizat o nouă clasă de solvenți nevolatili pentru pretratarea celulozei și anume lichidele ionice [32]. Procesul este ușor de operat, prezintă un consum mic de energie și nu afectează mediul înconjurător. S-a observat că celuloza regenerată din lichidul ionic utilizat este amorfă și poroasă și astfel mai ușor accesibilă celulelor [33]. Lichidele ionice care conțin anionii: clorură, formiat, acetat și alchilfosfat dizolvă celuloza datorită formării la temperaturi înalte a unor legături puternice de hidrogen, ceea ce face ca biomolecula de celuloză să se dizolve [34]. Solubilitate ridicată a celulozei de până la 25% respectiv 39% a fost raportată pentru clorura de 3-metil-N-butilpiridiniu [BMPy]Cl și clorura de 1-N-butil-3-metilimidazoliu [BMIM]Cl [35]. Lichidele ionice ce conțin anionii de tip fosfat și acetat sunt mai puțin vâscoase decât cele cu anionul clorură și mai stabile termic decât lichidele ionice ce conțin formiați [36], în schimb lichidele ionice cu anioni fosfați sunt mai ușor de sintetizat decât cele cu anion acetat, însă folosirea lor în pretratamentul paielor de grâu este limitată [37]. Kamiya și colaboratorii au fost primii care au raportat un studiu al procesului enzimatic de hidroliză a celulozei într-un sistem apa-lichid ionic (dietilfosfatul de 1-etil-3-metilimidazoliu [EMIM]DEP) și au dat primele informații despre utilizarea [EMIM]DEP ca solvent pentru materialele lignocelulozice.

Lichidele ionice care dizolvă celuloza pot de asemenea dizolva cel puțin parțial și deșeurile din lemn. Din tabel se observă că [AMIM]Cl a dizolvat complet toate tipurile de lemn studiate. [EMIM]Ac a fost capabil să dizolve parțial bradul, total molidul, fagul și castanul, iar ECOENG, [EMIM]Cl, [BMIM]Cl dizolvă parțial tipurile de lemn testate. În general, bradul s-a dovedit a fi cea mai recalcitrantă dintre sursele de lemn studiate. În prezența lichidelor ionice, pe lângă interacțiunile ionice mai sunt prezente și interacțiunile Van der Waals și legături de hidrogen. Astfel, lichidele ionice concurează cu componentele lignocelulozei asupra legăturilor de hidrogen, rupând rețeaua tridimensională, proces datorat anionilor (în special celor de clorură). Cu toate acestea, se presupune că și cationii interacționează cu celuloza, în special cu gruparea hidroxil [38,39]. Kilpelainen și colaboratorii au sugerat prezența interacțiunilor n-n între cationii lichidelor ionice și compuși aromatici din lignină. Utilizarea compusului [EMIM]Ac conduce la descompunerea aromatici din lignină și altor compuși din lemn, aspect observat și de Kilpelainen și colaboratorii, care au reușit să acetileze celuloza din lemnul dizolvat. [40, 41].

Yu-Cai și echipa sa au utilizat următoarea metodă de pretratament a paielor de grâu cu mai multe lichide ionice. Un amestec de 4% paie de grâu în lichid ionic a fost preparat prin amestecarea a 120 mg spice de grâu (paie) cu 3,0 g de lichid ionic (IL): [Emim]OAc, [Bmim]Cl, [Emim]DEP, [Emim]DBP, [EMBy]DEP. Amestecul a fost introdus într-un balon de 50 ml în atmosferă de azot pentru a împiedica hidratarea lichidului ionic. Soluția obținută a fost introdusă într-un reactor prevăzut cu agitare lentă și a fost incubată timp de 10, 30, 60 sau 120 de minute la temperaturi ce au variat de la 25 la 150 °C. Pentru regenerarea lignocelulozei din IL, peste amestecul de paie/lichid ionic s-au adăugat volume egale de anti-solventi: apa distilată, etanol și metanol, cu formarea imediată a unui precipitat. Probele au fost centrifugate, iar supernatantul ce conține lichidul ionic a fost îndepărtat și supus recuperării. Precipitatul a fost spălat de două ori cu anti-solvent și în final cu soluția tampon utilizată în etapa de hidroliză enzimatică. Biomasa lignocelulozică regenerată a fost uscată într-o etuvă la 60°C timp de 48 de ore [42].

II.3. Metodele combinate de pretratare

Aceste metode de pretratare a biomasei cuprind tratamente fizice și chimice. Un exemplu este expandarea cu aburi în prezența acizilor diluați, care conduce la îmbunătățirea randamentului hidrolizei enzimatică și diminuarea cantității de inhibitori formați. Metoda asigură îndepărtarea completă a hemicelulozei. Se poate recupera aproximativ 70% din xiloză [7].

II.3.1. Expandarea cu aburi în cataliză acidă

Expandarea cu aburi în cataliză acidă este unul din procedeele cele mai avantajoase pentru pretratarea lemnului de esență tare sau a reziduurilor provenite din agricultură, însă nu este eficientă pentru lemnul de esență moale. Dezavantajele sunt date de distrugerea parțială a xilanului, scindarea incompletă a structurii biomasei și generarea de inhibitori. Este necesară spălarea produsului, reducând astfel randamentul total al zaharidelor [7].

II.3.2. Expandarea fibrelor cu amoniac (AFEX, AMFE)

Aceasta metoda reprezintă una dintre cele mai avantajoase procedee de separare a componentelor biomasei, deoarece hidrolizatul obținut nu conține inhibitori.²¹ În aceste condiții nu este afectată structura proteică și se obțin coproduși valoroși, care compensează costurile ridicate. Metoda crește randamentul hidrolizei hemicelulozei din ierburi. Eficiența acestei variante de pretratare este redusă în cazul biomasei cu conținut redus de lignină [7].

II.3.3. Expandarea cu CO₂ este similară cu metoda expandării fibrelor cu amoniac, însă se obține un randament mai mic de glucoză (75%). Este un procedeu mai costisitor, dar nu permite formarea inhibitorilor [7].

II.4. Metodele biologice

Metodele biologice folosesc diverse ciuperci pentru solubilizarea ligninei. Biodelignificarea reprezintă degradarea ligninei sub acțiunea microorganismelor. Metoda utilizează o cantitate scăzută de energie [7].

Dezavantajele metodei sunt:

- viteza foarte mică a hidrolizei;
- derivații ligninei pot intoxica microorganismele.

Metodele biologice de pretratare a biomasei se pot combina cu cele chimice.

Fiecare dintre aceste procedee prezintă avantaje și dezavantaje din punct de vedere al costurilor, randamentelor, gradului de degradare a materiei prime și a produșilor nedorți formați. În tabelul II.1. este prezentată o comparație a celor mai avantajoase metode de pretratare. Alegerea variantei de pretratare influențează costul și performanțele etapelor ulterioare de hidroliză și fermentare. Un procedeu ideal de pretratare este simplu, determină creșterea reactivității fibrei, a randamentului de recuperare al pentozelor, nu permite formarea inhibitorilor, nu necesită reducerea dimensiunii biomasei și nu permite formarea de reziduuri solide [7].

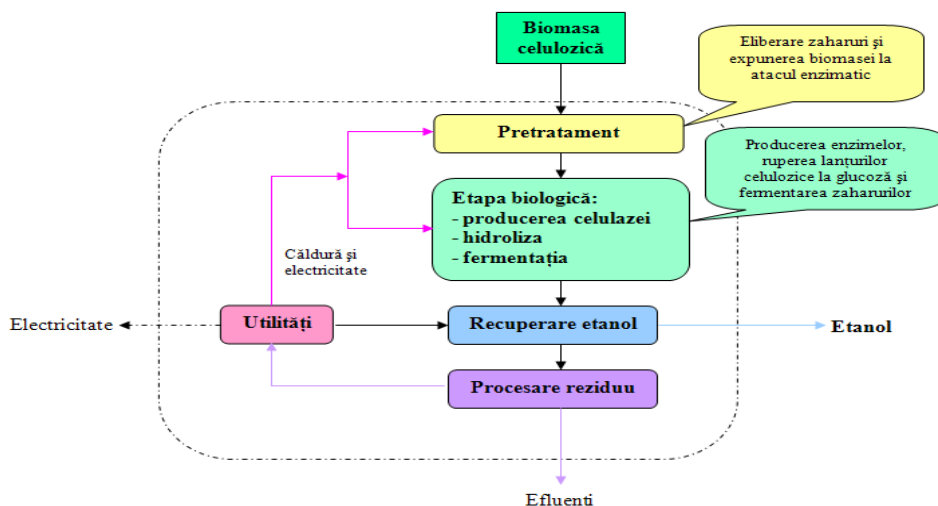


Figura II.4. Transformarea biologică a biomasei celulozice în etanol [30].

Tabelul II.1. Analiza comparativă a principalelor metode de pretratare a biomasei

Metoda de pretratare	Reactivi chimici	Temperatură/presiune	Timp de reacție	Randamentul xilozei (%)	Influența asupra hidrolizei enzimatică	Costuri	Aplicații industriale
Hidroliză cu acid diluat	Acid	>160°C	2-10 min	75-90	<85	+	da
Hidroliză bazică	Bază			60-75	55	++	da
Expandare cu aburi fără cataliză	-	160-260°C	2 min	45-65	90	-	peste 2-5 ani
Expandare cu aburi în cataliză acidă	Acid	160-260°C			88 (2 etape)	-	peste 2-5 ani
Tratare cu apă fierbinte	-	190-230°C (p>p _{sat})	45 s - 4 min	88-98	>90	-	peste 5-10 ani
Expandarea fibrelor cu amoniac	NH ₃	90°C	30 min		50-90 (2 etape)		
Expandare cu CO ₂	CO ₂	56,2 bar			75 (2 etape)		

CAPITOLUL III

Metode de hidroliză chimică

A doua etapă a procesului celulolitic de scindare a celulozei după etapa de pretratare utilizează o metodă de hidroliză chimică sau biologică.

III.1. Hidroliza acidă

Hidroliza acidă are loc în două etape, urmată de o pretratare acidă. Sunt două variante: cu acid diluat sau cu acid concentrat.

III.1.1. Hidroliza cu acid diluat

Hidroliza cu acid diluat este cea mai veche metodă de conversie a celulozei în etanol. În 1898 a fost construită prima instalație de acest fel. Prima etapă este esențială pentru hidroliza hemicelulozei. Pentru diminuarea cantității de produși de degradare ai zaharidelor (furfurali, etc) prima etapă se desfășoară în condiții blânde pentru recuperarea pentozelor (de exemplu 0,7% H₂SO₄, t = 190°C), iar în etapa a doua, solidul rămas care conține celuloza nescindată este supus unor condiții severe (t = 215°C, 0,4% acid) în vederea recuperării hexozelor. Timpul de reacție, în ambele etape, este de 3 minute. Zaharidele sunt recuperate cu randamente bune: manoză 89%, galactoză 82%, însă de doar 50% pentru glucoza. Hidrolizatul este apoi supus fermentării [2], [7].

III.1.2. Hidroliza cu acid concentrat

Hidroliza cu acid concentrat permite obținerea unor randamente foarte mari de zaharide (90%) din diferite tipuri de materiale lignocelulozice. Este o metodă relativ rapidă (10-12 ore). Din punct de vedere economic, însă, prezintă unele dezavantaje: necesită recuperarea acidului, determinând astfel o creștere a costului, echipamente speciale pentru evitarea coroziunii. Există mai multe metode pentru recuperarea acidului: separarea cu membrană care asigură un randament de 80% de acid recuperat, cu schimbători de ioni din care se recuperează peste 97% acid [2].

III.2. Hidroliza enzimatică

În timpul celui de-al doilea război mondial, în Pacificul de Sud, s-a observat existența unei ciuperci, *Trichoderma reesei*, care distrugea îmbrăcămintea de bumbac și corturile. Acest microorganism produce de fapt, celulaze care hidrolizează celuloza. Înlocuirea hidrolizei acide a celulozei cu metoda enzimatică a permis obținerea unor randamente mai mari în condiții de reacție mult mai blânde, costuri de producție mai reduse.[16] În anul 1995, aproximativ 93% din cantitatea

mondială de etanol a fost obținută prin metoda fermentativă și doar 7% prin sinteză.

Înlocuirea hidrolizei acide a celulozei cu o etapă de hidroliză enzimatică a reprezentat prima aplicație a enzimelor în procesul de obținere a etanolului din biomasa lignocelulozică. Hidroliza enzimatică a lignocelulozei este mult mai complicată decât cea a materiilor prime amidonoase sau zaharoase [2], [7], [43].

În tabelul III.1. sunt prezentate comparativ condițiile și performanțele hidrolizei acide și enzimatică [6].

Tabelul III.1. Analiza comparativă a celor trei metode de hidroliză a celulozei

Metoda	Reactivi	Temperatură (°C)	Timp de reacție	Randamentul de glucoză (%)	Impact asupra mediului
Hidroliză cu acid diluat	<1% H ₂ SO ₄	215	3 minute	50-70	deșeuri de gips
Hidroliză cu acid concentrat	30-70% H ₂ SO ₄	40	2-6 ore	90	deșeuri de gips
Hidroliza enzimatică	Celulaze	70	1,5 zile	75-95	nu

După pretratare, următorul pas este folosirea enzimelor pentru hidrolizarea fracțiunii celulozice și eliberarea glucozei. Hidroliza se desfășoară la 50°C, cu enzime (amestec de celulaze și β-gluco-zidaze).

Pentru îmbunătățirea eficienței hidrolizei enzimatică, rețeaua lignină-hemiceluloză trebuie slăbită. Tratarea cu acid diluat este folosită pentru degradarea hemicelulozei lăsând rețeaua formată din lignină și celuloză în substrat. Alte tratamente includ hidroliza alcalină sau pretratarea microbiană cu fungi de tipul *Phaenerochate chrysosporium*, *Cyathus stercoreus*, *Cythus bulleri* și *Pycnoporus cinnabarinus*, etc.) care acționează în special asupra ligninei lăsând rețeaua celulozei și hemicelulozei în partea reziduală. În timpul ambelor procese de tratare, o cantitate considerabilă de carbohidrați este degradată, din acest motiv recuperarea carbohidraților nu este satisfăcătoare pentru producerea etanolului [44], [45].

Hidroliza enzimatică a biomasei lignocelulozice reprezintă cea mai avantajoasă metodă de zaharificare, fiind un procedeu foarte specific, care decurge fără reacții secundare și cu randament ridicat [2], [46], [47]. În plus, datorită condițiilor blânde de conversie, costurile de producție sunt scăzute. Cu toate acestea, este considerat, deocamdată, un proces ineficient. Astfel, pentru hidroliza biomasei pretratate sunt necesare de 100 de ori mai multe enzime decât pentru hidroliza amidonului. Astfel, dacă 1 galon de etanol produs din amidon costă 1-2 dolari, pentru etanolul obținut din celuloză costul este mult mai mare (aproximativ 10 dolari/galon) [2], [48].

Zaharificarea enzimatică necesită o pretratare a materialelor lignocelulozice pentru a facilita hidroliza enzimatică. Într-o primă etapă, materia primă este prelucrată fizic (mărunțire și spălare) pentru reducerea dimensiunii și îndepărtarea impurităților, după care substratul este tratat fizic sau chimic pentru a solubiliza parțial hemiceluloza și lignina. În cazul materiilor prime amidonoase, etapa de pretratare (măcinare) determină o creștere a vitezei de scindare enzimatică [2], [24].

Conversia biologică a biomasei la etanol cuprinde 4 etape:

- producerea celulazelor,

- hidroliza celulozei,
- fermentarea hexozei,
- fermentarea pentozelor.

Procedeul în care hidroliza și fermentarea se desfășoară separat (SHF) necesită 4 reactoare față de 2-3 reactoare (funcție de tipul de procesare a pentozelor) pentru procedeul în care hidroliza și fermentarea se desfășoară simultan (SSF). Există și o variantă de bioprocésare, în care producerea celulezelor, hidroliza și fermentarea au loc într-un singur reactor. Se studiază obținerea unei noi tehnologii SSF în care să existe cofermentarea hexozelor și pentozelor. În ambele variante, SSF și SHF, se folosește un tip de microorganism pentru producerea celulezelor și un alt tip pentru fermentare. Procedeul de bioprocésare (CBP) este mult mai puțin dezvoltat decât SSF, dar se estimează că poate fi extrem de avantajos. Avantajul acestuia este că se utilizează un singur gen de microorganism atât pentru producerea celulezelor cât și pentru fermentare. Alcoolul rezultat în urma fermentării se supune distilării, apoi este introdus într-o coloană de rectificare, obținându-se în final etanol cu o concentrație de 95% [49].

Teoretic, lignina nefermentată rămasă după obținerea etanolului poate fi transformată în diferiți compuși chimici, însă în general, se folosește drept combustibil în industrie. Solidul uscat, bogat în lignină, rezultat după fermentare este un combustibil cu caracteristici asemănătoare turbei. Chiar dacă, nu constituie mai mult de 25% din masa lemnului de esență tare uscat, lignina generează peste o treime din valoarea căldurii generată de materialele lemnoase. Niciunul dintre deșeurile solide rezultate (cenusă, compuși rezultați după neutralizarea acidului) nu sunt considerate periculoase pentru mediul ambiant [49], [50].

Transformarea biochimică a biomasei în etanol constă în:

- producerea și aplicarea unor preparate enzimaticе (celulaze și hemicelulaze) care să hidrolizeze polizaharidele, din pereții celulari ai plantelor, în amestecuri de zaharide simple;
- fermentarea, mediată de bacterii sau drojdii, care transformă zaharidele în etanol.

Caracteristicile structurale ale biomasei lignocelulozice: cristalinitate, gradul de polimerizare al celulozei, conținutul de lignină, dimensiunea substratului influențează procesul de hidroliză enzimatică. Astfel, pentru o concentrație mică de substrat viteza hidrolizei enzimaticе va fi scăzută și randamentul mic. Raportul substrat/enzime nu trebuie să aibă o valoare foarte mare pentru a evita astfel, inhibarea. Hidroliza poate fi îmbunătățită prin adăugarea unor surfactanți, prin utilizarea unui amestec de celulaze provenite de la diferite microorganisme sau a altor enzime, cum este de exemplu pectinaza. Acești surfactanți facilitează desorbția celulozei după terminarea reacției.

Cercetările efectuate asupra hidrolizei enzimaticе au demonstrat că îmbunătățirea randamentului și vitezei de reacție au loc doar prin creșterea activității enzimaticе în etapele de hidroliză și fermentare sau prin combinarea în același reactor a unor etape distincte. Produsul intermediar și final al hidrolizei, celobioza și glucoza, inhibă activitatea celulezelor. Acest lucru poate fi evitat, prin introducerea unor cantități suplimentare de enzime sau înlăturarea produsului, imediat după formare, prin ultrafiltrare sau prin fermentare simultană în același reactor. Enzimele pot fi recuperate și reciclate, astfel încât să se asigure o concentrație enzimatică ridicată. În cazul în care pretratarea biomasei se realizează prin metode chimice, se impune îndepărtarea din hidrolizat a inhibitorilor formați [6], [51].

III.2.1. Influența caracteristicilor peretelui celular asupra procesului de zaharificare

Zaharificarea enzimatică a biomasei este influențată de structura materiei prime, de caracteristicile peretelui celular al materiei prime, de condițiile de hidroliză, incluzând și amestecul de enzime și nu în ultimul rând de pre-tratamentul aplicat [52], [53], [54].

Structura biomasei influențează penetrarea soluției enzimatice în structura materialului celulozic necesară zaharificării peretelui celular. Sunt importante diferitele nivele structurale: nivelul țesutului, nivelul celular și nivelul peretelui celular [2], [55].

Caracteristicile importante ale peretelui celular care influențează gradul hidrolizei sunt:

1. mărimea particulelor/aria suprafeței specifice;
2. cristalinitatea celulozei;
3. reactivitatea celulozei;
4. gradul de polimerizare;
5. conținutul de lignină.

1. Mărimea particulelor/ aria suprafeței specifice - eficiența zaharificării enzimatice depinde mult de contactul dintre enzimă și substrat. Teoretic, viteza hidrolizei enzimatice crește cu scăderea dimensiunilor particulelor. Granulația are un rol important, astfel încât cu cât suprafața specifică este mai mare cu atât va crește cantitatea de enzimă adsorbită și implicit va crește și gradul de zaharificare.

Influența mărimii particulelor are un rol încă neclarificat. Într-un studiu realizat pe lemn pretratată, s-a găsit că gradul de zaharificare crește cu scăderea mărimii granulelor. Însă pretratarea nu reduce numai mărimea particulelor, ci modifică și alte caracteristici ale substratului, facilitând astfel procesul de fermentare [2], [56].

2. Cristalinitatea celulozei - structura cristalină a celulozei are un efect puternic asupra zaharificării. Regiunile amorfe din celuloză sunt hidrolizate primele, iar cele cristaline sunt puțin degradate. S-a constatat că eficiența procesului de zaharificare nu depinde de cristalinitatea celulozei în cazul biomasei celulozice sau lignocelulozice pretratate [52], [53]. Structura celulozei nu este încă bine înțeleasă, de aceea nu este bine cunoscută influența acesteia asupra activității celulozei și rezultatele raportate sunt contradictorii. În majoritatea cazurilor s-a constatat că procesul de zaharificare este puternic influențat de cristalinitatea celulozei [2], [52].

S-a arătat că prin creșterea cristalinității gradul de hidrolizabilitate scade și au fost raportate corelații negative între creșterea cristalinității și eficiența zaharificării la probele de celuloză pură [55], [57]. Alte studii au ajuns în schimb la concluzia că eficiența zaharificării nu este influențată de cristalinitate [2], [58].

3. Reactivitatea celulozei - S-a arătat că gradul de hidrolizabilitate scade în timp. Introducerea unor noi enzime accelerează hidroliza enzimatică, dovedind astfel că nu are loc o modificare a reactivității substratului în timpul hidrolizei, ci faptul că enzimele hidrolitice blochează suprafața substratului. Scăderea activității celulozei în timp este explicată prin blocarea suprafeței substratului de enzima hidrolitică. Acest fapt duce la concluzia că în timpul hidrolizei nu are loc o scădere a reactivității substratului [59].

4. *Gradul de polimerizare* - este definit ca numărul total al resturilor glicozidice de pe un lanț de celuloză [52]. Astfel, un material cu un grad scăzut de polimerizare are multe terminații de lanț. Gradul de polimerizare variază între limite diferite și este influențat de modul de pregătire a materialului. Așa cum s-a arătat anterior, endoglucanazele acționează pe lanțurile de celuloză din microfibre și eliberează capetele de lanț. Această capacitate a enzimei pare a nu fi influențată de gradul de polimerizare [2], [60]. Celobiohidrolazele dovedesc o activitate crescută pe substraturile cu grad de polimerizare scăzut.

5. *Conținutul de lignină* - afectează eficiența zaharificării. Enzimele hidrolitice sunt adsorbite pe lignină în materialele lignocelulozice. Astfel încât este foarte importantă separarea ligninei de celuloză în timpul etapei de pretratare. Pentru a spori eficacitatea fermentării nu este necesară îndepărtarea completă a ligninei [2], [54].

Lignina are rolul de protecție a polizaharidelor împotriva atacului enzimelor. Astfel, în faza de pretratare este importantă separarea ligninei, pentru a ușura procesul de zaharificare [61]. Nu este însă necesară îndepărtarea completă a ligninei pentru a crește degradabilitatea celulozei. Lignina se aglomerează în globuri/particule mici, care sunt atașate de peretele celular [62], aglomerații de lignină fiind detectați în peretele celular din lemnul de pin prin expandare cu abur și prin tratarea lemnului cu hidroxid de calciu [63]. Însă în urma acestui tratament lignina a acoperit microfibrele de celuloză, ducând la scăderea gradului de hidroliză [64], [65].

6. *Gradul de O-acetilare* - influențează zaharificarea întrucât datorită grupelor acetil, substratul este împiedicat steric [53]. Se presupune că grupările acetil împiedică steric enzimele hidrolitice. Este recomandată studierea *in muro* a substratului, pentru a evita modificările structurale care pot surveni la izolarea celulozei. În biorafinării se pot utiliza diverse materii prime: ierburi perene, arbori, deșeuri provenite din agricultură, care pot fi recoltate și folosite în diferite stadii de maturitate. Identificarea unei materii prime ideale necesită o caracterizare prealabilă a proprietăților peretelui celular [66].

III.2.2. Enzime pentru hidroliza peretelui celular

Pentru scindarea polizaharidelor din structura biomasei este necesară acțiunea sinergică a unui amestec de *enzime* (celulazele, hemicelulazele și alte glicozil hidrolaze), *ciuperci* (*Trichoderma reesei*) și *bacterii*. Se cunosc diverse specii de bacterii celulozice (bacterii cu toleranță la concentrații de oxigen, temperatură și concentrații de sare). Complexitatea acestor sisteme enzimatică depinde de tipul de substrat folosit [12], [67].

Pentru o degradare completă a biomaterialului sunt necesare mai multe enzime hidrolitice (hidrolaze) și uneori comunitățile de bacterii acționează împreună pentru a realiza hidroliza totală [2]. În principiu enzimele lignocelulozice pot fi clasificate în mai multe clase, în funcție de natura substratului asupra căruia acționează:

- celulaze
- hemicelulaze
- ligninaze.

Celulazele sunt produse de bacterii și ciuperci. Reprezintă un amestec de enzime care acționează sinergic asupra fibrei celulozice. Deși există mai multe posibilități, fie de producere a celulazelor în reactoare individuale, fie de achiziționare, varianta cea mai avantajoasă din punct de vedere economic este aceea în care producerea celulazelor, hidroliza și fermentarea se desfășoară în același reactor [6].

Lanțurile de celuloză sunt scindate în glucoză de către celulaze, în condiții relativ blânde (temperatură de 50°C și pH = 5), fără să se obțină produși secundari, care inhibă activitatea enzimatică. Prin această metodă, se obține etanol cu randamentul cel mai ridicat [2].

Cele mai multe sisteme de celulaze sunt alcătuite din trei tipuri de enzime, proteine care acționează împreună pentru a cataliza procesele de transformare biologică: endoglucanaze, exoglucanaze (celubiohidrolaze) și betaglucozidaze;

- endoglucanazele hidrolizează legăturile interne din lanțul celulozei, acționând, în special, asupra părților amorfe ale celulozei;
- celubiohidrolazele hidrolizează părțile terminale ale lanțurilor, cu formarea celobiozei, care poate fi scindată în celuloză cristalină;
- betaglucozidazele hidrolizează oligozaharidele scurte din celuloză (celobioza) în două molecule de glucoză [2], [5].

Hemicelulazele includ enzime care scindează atât unități de xilan unite prin legături β -1,4 glucozidice (xilanaze și β -xilozidaze) și diverse catene laterale (α -1-arabinofuranozidaze, α -glucuronidaze, acetil xilan esterase, acid ferulic esterase și α -galactozidaze) [2], [5].

Prin expunerea fibrelor de celuloză, hemicelulazele, facilitează hidroliza celulozei. Întrucât cea mai utilizată metodă de pretratare a fost cea cu acid diluat, prin care are loc îndepărtarea hemicelulozei înainte de zaharificare, sunt disponibile doar câteva tipuri de hemicelulaze pentru hidroliza lignocelulozei. Dezvoltarea metodelor de pretratare în urma cărora fracția hemicelulitică rămâne intactă implică, utilizarea hemicelulazelor.

Enzimele care degradează peretele celular al plantei pot să aparțină unor sisteme mai mult sau mai puțin complexe. Studiile recente efectuate pe sistemele enzimatiche complexe, celulozome, din bacterii și ciuperci anaerobe au permis izolarea unor noi tipuri de celulaze și hemicelulaze. Cercetările actuale din domeniul ingineriei genetice sunt orientate asupra *reducerii* costurilor celulazelor provenite din sisteme enzimatiche simple și *obținerii* unor ciuperci care pot produce cantități mari de enzime: celulaze, xilaze și hemicelulaze, care pot fi apoi utilizate pentru transformarea unor reziduuri din agricultură în zaharide fermentabile din care se poate obține etanol celulozic. Astfel, celulazele din ciuperca anaerobă, *Trichoderma reesei*, sunt enzimele cele mai utilizate pentru obținerea bioetanolului în laborator și la scară pilot [2].

III.2.3. Structura celulazei

Celulazele sunt enzime modulare compuse din unități structurale și funcționale independente, numite domenii sau module, cu acțiune relativ lentă, datorită structurii complexe, insolubile și naturii semicristaline a substratului.[66,65] Pe baza asemănării dintre secvențele de aminoacizi din centrele catalitice, enzimele sunt clasificate în familii. Acest sistem de clasificare este bazat pe faptul că similaritatea secvențelor de aminoacizi reflectă atât conservarea structurii pliate cât și a mecanismului catalitic.[66] Chiar și în lipsa similarității secvențelor de

aminoacizi, unele familii de enzime se pot grupa sub forma unor așa-numite „clanuri”. Membrii acestora prezentând o zonă de pliery comună, iar poziția resturilor de aminoacizi din centrul catalitic este menținută. Cel mai mare asemenea clan (GH-A) este alcătuit din șase familii de celulaze și satisface ambele criterii. În ultimii ani a existat o tendință de a determina mai întâi structura atomică și apoi de a identifica resturile catalitice ale membrilor unei familii de celulaze. Structurile unor reprezentanți ai clanurilor și familiilor mai importante sunt prezentate în Figura III.1. [68], [69], [70].

Hidroliza celulozei este însoțită fie de inversia, fie de retenția configurației carbonului asimetric și în ambele cazuri este catalizată în primul rând de două grupe carboxil localizate în centrul catalitic al enzimei [71], [72].

Enzimele cu *inversie de configurație* prezintă un mecanism într-o singură etapă în timp ce enzimele cu *retenție de configurație* acționează după un mecanism în două etape, în timpul căruia se formează un intermediar enzimă-substrat, iar substratul suferă o deformare în interiorul centrului activ al enzimei [72]. Înțelegerea acestui proces a fost ușurată de modelarea derivaților de oligozaharide nehidrolizabile și analogilor de tranziție care pot fi reținuți în interiorul centrului activ al enzimei și complexul astfel format poate fi analizat prin metode structurale [73], [74], [75], [76], [77]. Pentru măsurarea constantei de viteză a reacțiilor catalizate de celulaze, a fost conceput un substrat bifluorogenic [78].

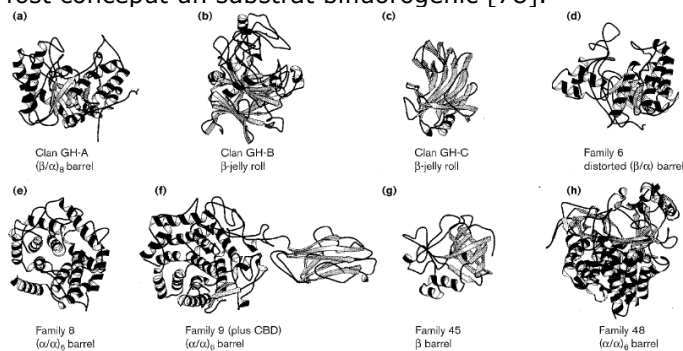


Figura III.1. Diagrame structurale prezentând plierile cunoscute ale domeniilor catalitice din clanuri și familii reprezentative de celulaze [78]

Pe baza specificității de substrat celulazele au fost clasificate în endo- și exoglucanaze (sau celobiohidrolaze), în concordanță cu capacitatea lor de a rupe legături β -1,4-glicozidice din interiorul sau de la capătul lanțului de celuloză. Deși această împărțire continuă să fie utilă, unele celulaze prezintă ambele moduri de acțiune și astfel elementele definitorii au devenit structura și mecanica moleculară.

Arhitectura celulazelor din interiorul sau din vecinătatea centrului activ nu este pe deplin lămurită și informația privind modul de legare al lanțului de celuloză, este critică pentru a înțelege modul de acțiune al celulazelor [79], [80].

Activitatea celolitică a centrului catalitic este modificată de celelalte module adiționale existente, care pot să completeze sau să modifice proprietățile generale ale enzimei. Cel mai întâlnit asemenea modul este domeniul de legare al celulozei (CBD), care a fost descris pentru mai mult de douăsprezece familii diferite de celulaze, pe baza secvențelor omoloage [81]. În ultimi ani, contribuțiile domeniului de legare al celulozei asupra modului de acțiune al celulozei pe substraturi celulozice a fost un subiect de cercetare intensă. La fel ca în cazul domeniilor catalitice, structurile pentru CBD din fiecare familie de celulaze sunt acum elucidate cu ajutorul cristalografiei sau prin spectroscopie RMN [82], [83].

Funcția principală a domeniului de legare (CBD) este de a favoriza accesul centrului catalitic la celuloza cristalină. Legarea pare să fie destul de puternică, deși enzima poate să sufere o difuziune pe suprafața substratului [84]. Unele domenii de legare par să realizeze și ruperea legăturilor necovalente dintre lanțurile de substrat cristalin, altele legând preferențial substraturile necristaline [85], [86], [87].

Unele celuloze au o arhitectură mai complexă, prezentând mai multe domenii catalitice sau/și de legare în aceeași structură proteică [88].

III.2.4. Mecanismul hidrolizei celulozei

S-a sugerat că mecanismul hidrolizei celulozei implică, pe lângă acțiunea endo- și exo- enzimelor și ruperea fizică a celulozei insolubile [89], [90], [91]. Termenul de "amorfogeneză" descrie modificările fizice (de ex: umflarea, segmentarea sau destratificarea celulozei) care sporesc hidroliza enzimatică și lasă celuloza cristalină mai accesibilă acțiunii celulozei [92]. Accesibilitatea crescută a celulozei în timpul hidrolizei enzimatice a fost atribuită mai multor factori (producerea de H_2O_2 în prezența ionului de Fe, factorul de formare al fibrelor scurte în filtratele celulozei din *Trichoderma koningii*, celobiohidrolaza CBH₁ din *T. reesei* sau domeniul ei catalitic, domeniul catalitic al CBH₂, complexul de endo- și exoglucanaze din *T. reesei*, CBH₂ din *Humicola insolens*, celulozele E₃ și E₅ din *Thermomonospora fusca*, câteva domenii necatalitice ale celulozei, ca de exemplu modulul de legare (CBM) al endoglucanazei A din *C. Fimi*, o polipeptidă din *T. pseudokoningii* generatoare de fibre scurte, o proteină din *T. reesei* cu M=11,4 kD producătoare de fibrile și o nouă proteină din *T. reesei* numită swoleină cu masa moleculară de 49 kD [85], [93], [94], [95], [96], [97], [98], [99], [100], [101], [102], [103], [104], [105], [106].

S-a observat că structura heterogenă a celulozei duce la o scădere rapidă a vitezei în reacția de hidroliză, chiar și atunci când se ia în considerare efectul dezactivării celulozei și a inhibiției produsului [107], [108]. Reactivitatea scăzută a resturilor de celuloză din timpul hidrolizei enzimatice este rezultatul unor factori cum sunt: aria suprafeței mai mică, puține capete de lanț accesibile, precum și adsorbția celulozei inactive pe suprafața particulelor de celuloză. La nivel macroscopic, s-a arătat că atât aria celulozei accesibile (măsurată cu metoda Brunauer- Emmett-Teller BET) cât și capacitatea de adsorbție a celulozei pe gram de celuloză, scad odată cu creșterea gradului de hidroliză [2], [109], [110]. De asemenea, se poate presupune că și disponibilitatea glucanilor și a capetelor de lanț ar putea scădea odată cu creșterea conversiei. La nivel microscopic, celobiohidrolaza CBH₁ din *T. reesei* rupe (dizlocă) fibrele, ceea ce duce la o arie a suprafeței mai mare, în timp ce endoglucanaza EG II se pare că netezește suprafața fibrei, rezultând astfel o scădere a acesteia [95], [97]. Adăosul de substrat proaspăt poate stimula eliberarea de zaharuri mai solubile, ceea ce indică o pierdere a reactivității celulozei la sfârșitul hidrolizei și/sau reactivitate crescută pentru "noile" întâlniri celuloză/celuloză în comparație cu cele "vechi" [2], [111].

Atunci când sistemele enzimatice de celuloze acționează *in vitro* asupra substraturilor insolubile de celuloză au loc simultan trei procese:

- 1) modificări chimice și fizice în substrat;
- 2) hidroliza primară, ce presupune eliberarea de intermediari insolubili de pe suprafața moleculelor de celuloză reactante;
- 3) hidroliza secundară, ce implică hidroliza intermediarilor solubili la intermediari cu masă moleculară mai mică și în final la glucoză, așa cum este arătat în figura III.2.

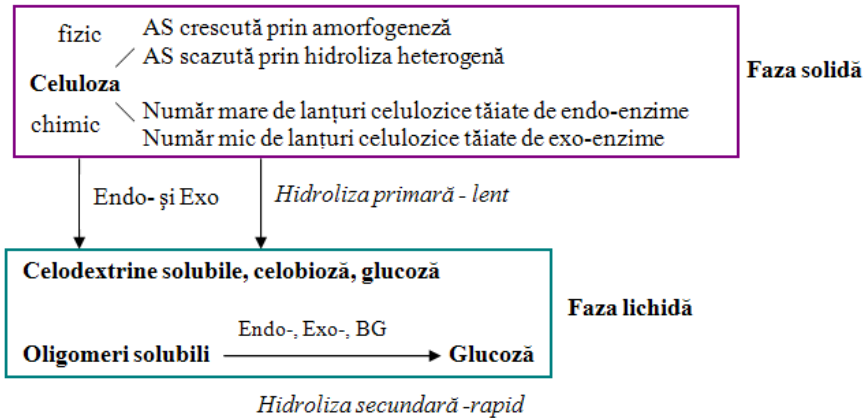


Figura III.2. Mecanismul ipotetic al hidrolizei enzimatice a celulozei cu celulază din *T. reesei*

Modificările chimice în resturile de celuloză s-au manifestat ca și modificări ale gradului de polimerizare (DP) și ale concentrației capetelor de lanț. Endoglucanazele cresc concentrația capetelor de lanț și scad semnificativ gradul de polimerizare prin acțiunea asupra interiorului moleculelor de celuloză. Exoglucanazele reduc gradul de polimerizare marginal și doar ocazional scad concentrația capetelor de lanț.

Se presupune că endoglucanazele ar fi primele responsabile de modificările chimice care au loc în timpul hidrolizei asupra celulozei din faza solidă și joacă un rol minor în solubilizarea acesteia, în timp ce exoglucanazele sunt responsabile în primul rând pentru solubilizarea celulozei și modifică foarte puțin proprietățile chimice ale resturilor de celuloză. Modificările fizice ale resturilor de celuloză sunt modificări ale ariei suprafeței accesibile datorate modificărilor geometrice cauzate de solubilizarea progresivă. Se speculează că, în prezent componente ale sistemelor enzimatice de celuloze pot să realizeze suprafețe adiționale disponibile, prin mecanisme diferite de cele ale hidrolizei. Din moment ce hidroliza secundară este mai rapidă decât hidroliza primară, este posibil ca celodextrinele (dextrine constituite de lanțuri celulozice mai scurte) solubile să reprezinte o fracțiune importantă din producția hidrolizei primare dar să nu fie detectați. În timpul hidrolizei enzimatice, celodextrinele cu gradul de polimerizare >4 sunt prezente în faza solidă asociate cu celuloza cristalină, sugerându-se că această asociere împiedică eliberarea lor în soluție [112], [113], [114], [115]. O schemă a mecanismului de reacție este prezentată în Figura III.3.

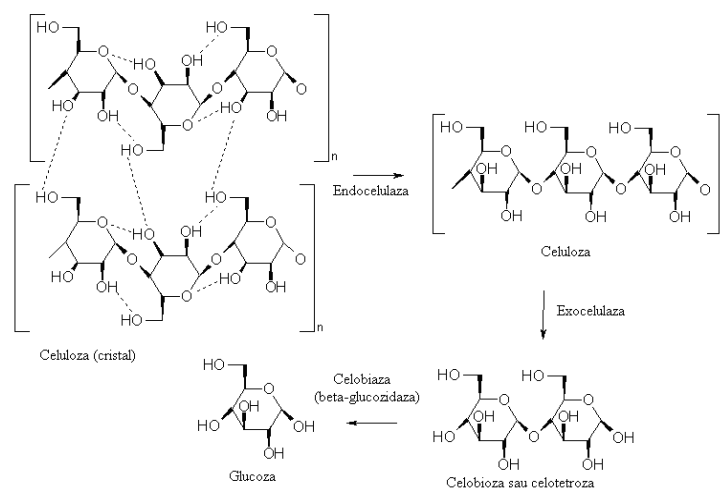


Figura III.3. Cele trei tipuri de reacții catalizate de celulaze [113]

III.2.5. Efecte sinergetice la acțiunea enzimelor complexului celulazic

Un sistem de celulaze reprezintă un complex alcătuit din mai multe enzime, care acționează sinergetic la hidroliza celulozei [12]. Sinergismul are loc atunci când activitatea complexului de componente este mai mare decât suma activității acestora evaluate separat [116], [117], [118].

Conversia completă a celulozei în glucoză are loc doar printr-o activitate enzimatică maximă, care necesită acțiunea sinergică a endogluconazelor, exogluconazelor și a β -glucozidazelor [2].

Tipurile de sinergism propuse în literatura hidrolizei celulozei includ:

- 1) endogluconaze și exogluconaze;
- 2) exogluconaze și endogluconaze [1117], [119], [120];
- 3) endogluconaze și endogluconaze [121], [122], [123];
- 4) exogluconaze sau endogluconaze și β -glucozidaze, care reduc inhibiția de către celobioză [2], [124];
- 5) sinergismul intramolecular între domeniul catalitic și CBM sau între două domenii [125], [126], [127];
- 6) sinergismul celuloză-enzimă-microorganism [128];
- 7) sinergismul de proximitate datorită formării de complexe celulazice [129], [130], [131]. Sinergismul celulă-enzimă-microorganism nu a fost evaluat cantitativ, dar a fost postulat pentru sisteme în care o celulă metabolic activă împreună cu celulele aderate la ea se leagă de celuloză [2].

Sinergismul între endogluconaze și exogluconaze este cel mai studiat tip de sinergim și este cel mai important din punct de vedere cantitativ pentru hidroliza celulozei cristaline.

În afară de proprietățile substratului, condițiile experimentale afectează de asemenea gradul de sinergism observat. S-a observat că sinergismul endo-exo crește odată cu creșterea încărcării enzimaticе până la saturație, dar scade în cazul supraîncărcării cu enzimă peste valoarea de saturație [132]. O asemenea sinergie este raportată a fi mai mare în condiții alese pentru a minimiza inhibiția de către

produsele solubile hidrolizate în anumite cazuri, dar nu în toate studiile [2], [133], [134].

III.2.6. Clasificarea procedeeor de hidroliză enzimatică

În cazul hidrolizei enzimatică se pot folosi mai multe tipuri de procedee. O condiție obligatorie, în toate aceste cazuri este pretratarea biomasei pentru a facilita acțiunea enzimelor și hidroliza hemicelulozei [6].

III.2.6.1. Fermentarea și hidroliza separat

Prima aplicație a enzimelor la prepararea etanolului din lemn a constat în simpla înlocuire a etapei de hidroliză acidă a celulozei, cu etapa de hidroliză enzimatică: procedeul de fermentare și hidroliză separată sau consecutiv (**SHF**) (figura III.4).

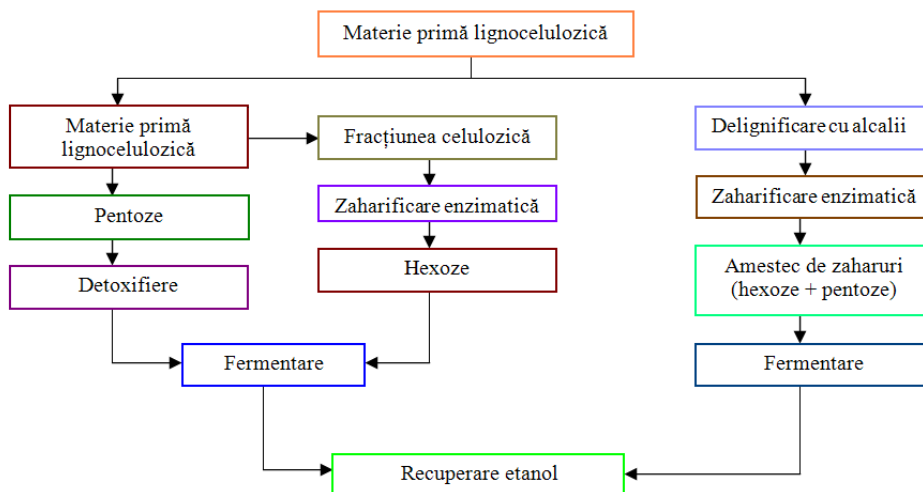


Figura III.4. Hidroliza și fermentarea separată (SHF)[6]

Hidrolizatul provenit de la reactoarele de hidroliză este întâi introdus în reactorul în care are loc fermentarea glucozei. Prin distilarea amestecului se separă etanolul de xiloza nefermentată. În cel de-al doilea reactor, are loc fermentarea xilozei la etanol, care este din nou distilat. Temperatura de lucru este de 28°C, valoare mult mai scăzută decât temperatura optimă la care acționează celulele (50°C). Chiar și în condițiile în care temperatura de operare este adusă la 37°C, sistemul SHF nu este eficient, întrucât permite contaminarea microbiană. Etapele de hidroliză a celulozei și fermentarea glucozei se pot desfășura în paralel față de fermentarea xilozei. Deocamdată însă, acest procedeu nu este aplicat la scară industrială [6].

Această metodă oferă numeroase avantaje și oportunități de procesare: activează enzimele pentru a putea opera la temperaturi mai ridicate, pentru creșterea performanței și fermentarea organismelor operează la temperaturi moderate, optimizând folosirea zaharurilor. Alte avantaje constau în folosirea unui număr redus de reactoare și evitarea problemelor determinate de formarea

inhibitorilor. Costurile de producție sunt influențate de prețul celulezelor și al raportului dintre hidroliză și fermentație. Timpul optim de reacție este de 3-4 zile [6].

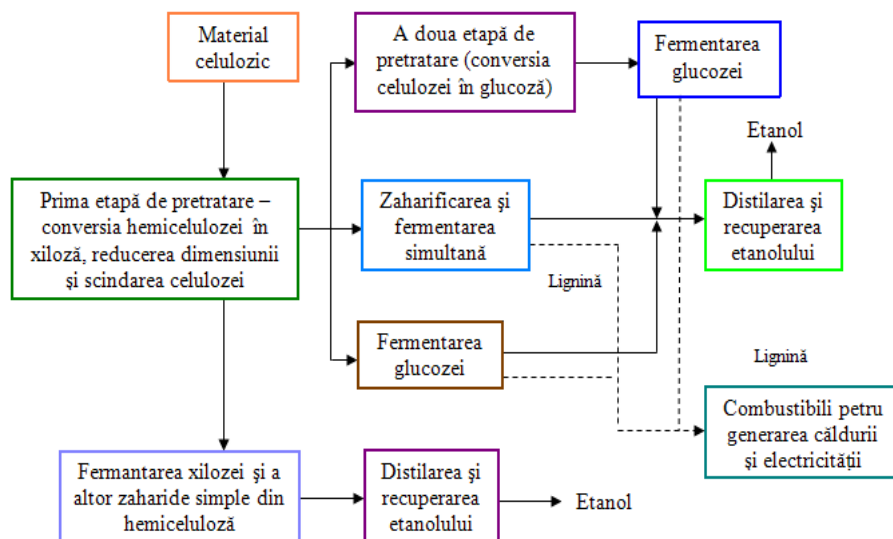


Figura III.5. Reprezentarea schematică a obținerii etanolului din lignoceluloză printr-un proces SHF [135]

Zaharidele fermentabile se obțin din materialele lignocelulozice prin procese de hidroliză enzimatică sau chimică. O caracteristică a biomasei lignocelulozice este formarea hidrolizatului celulozic (alcătuit din hexoze) alături de cel hemicelulozic, care este alcătuit dintr-un amestec de hexoze și pentoze. În cazul în care hidrolizatului provine din lemnul de esență tare, zaharida predominantă este xiloza [135].

Materialele lignocelulozice, în special, deșeurile provenite din lemnul de esență tare, din agricultură, au un conținut între 5-20% pentoze (xiloză și arabinoză), care nu pot fi fermentate la etanol de microorganismele fermentatoare din industrie, drojdia *Saccharomyces cerevisiae*. Xiloza este componenta majoritară, pe când arabinoza constituie doar 14-15% din cocii de porumb sau tărâțele de grâu. Majoritatea cercetărilor sunt orientate în vederea găsirii unor microorganisme care să poată fermenta xiloza [136], [137], [138].

Pentru fermentarea xilozei se folosesc diverse microorganisme: bacterii, drojdii și ciuperci filamentoase. Bacteria anaerobă, *Zymomonas mobilis* fermentează pentozele, dar activitatea ei este inhibată chiar și de concentrații scăzute de zaharide și etanol. În procesul de fermentare se formează produși secundari, nedorțiți. Drojdia, *Pichia stipitis* CBS 6054, fermentează xiloza cu randamente bune, însă este inhibată de produșii de degradare formați în timpul pretratării și hidrolizei substratului lignocelulozic.

Ciupercile filamentoase tolerează prezența inhibitorilor, însă acțiunea lor este mult prea lentă pentru a fi competitive în procesele industriale. Au fost efectuate numeroase studii pentru obținerea unor tulpini recombinante de bacterii și drojdii care să fie eficiente în etapa de fermentare industrială a lignocelulozei (figura III.6) [136].

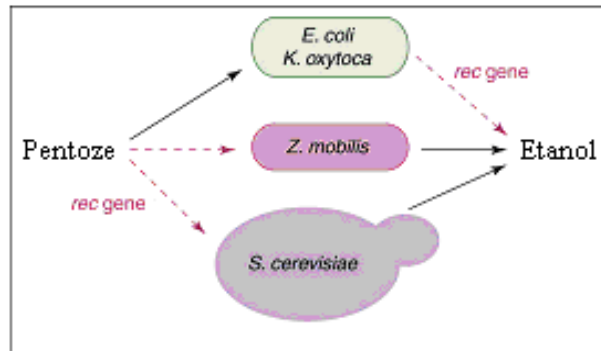


Figura III.6. Tulpini de microorganisme modificate genetic pentru producerea etanolului din pentoze[136]

Tulpinile de *Escherichia coli* și *Klebsiella oxytoca*, capabile să fermenteze pentozele, au fost obținute prin introducerea unor gene etanologice de *Zymomonas mobilis*. Prima tulpină de *S. Cerevisiae* care fermentează pentozele a fost generată prin introducerea genelor din enzima *P. Stipitis*. Ulterior, tulpini de *S. Cerevisiae* care pot fermenta xiloza au apărut prin folosirea genelor din bacteria *Thermus thermophilus* și ciuperca anaerobă *Piromyces sp* [136].

III.2.6.2. Procedeu de zaharificare și fermentare simultană (SSF)

Cel mai important proces de îmbunătățire a hidrolizei enzimatică a biomasei este introducerea zaharificării și fermentării simultane (SSF), care a fost îmbunătățit prin cofermentarea multiplelor substraturi ale zaharurilor.

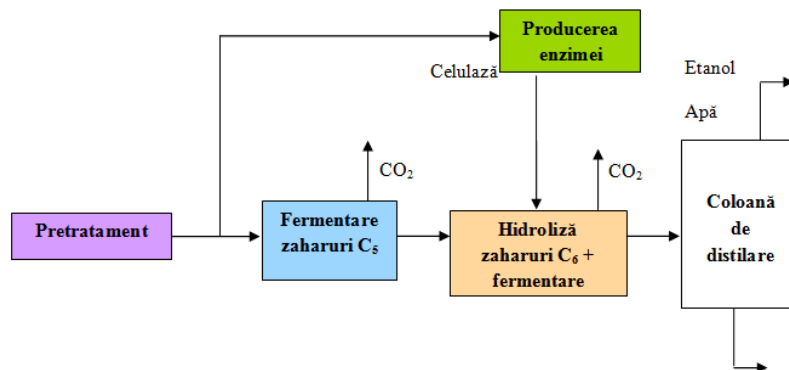


Figura III.7. Zaharificarea și fermentarea simultană (SSF)[139]

Această metodă face posibilă obținerea zaharidelor și fermentarea lor la etanol într-o singură etapă. Zaharificarea și fermentarea simultană a ambilor polimeri, celuloză la glucoză și hemiceluloză la xiloză și arabinoză, va fi efectuată cu drojzii recombinante sau organisme care au abilitatea de a folosi și pentoze și hexoze. Avantaje: posibilitatea de recirculare a procesului, care rezultă la creșterea energiei necesare și reducerea cantității de apă necesară procesului. Adaptarea

drojdiei la inhibitorii prezenți este un factor important în proiectarea procesului SSF [21], [139].

Cercetările recente, au demonstrat un model structural de SSF al amidonului la etanol prin modificări genetice a *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G, folosind 2 concepte:

- Primul concept, un mecanism de hidroliză enzimatică a amidonului la glucoză prin acțiunea combinată a 2 enzime (α -amilaze și glucoamilaze) obținute prin recombinarea drojdiei;

- Al doilea concept, degradarea enzimatică a amidonului la glucoză și utilizarea glucozei, simultan [21].

SSF combină hidroliza enzimatică cu fermentația etanolului pentru menținerea concentrației scăzute a glucozei. Acumularea etanolului în fermentator, nu inhibă acțiunea celulozei la fel de mult ca și concentrația glucozei; astfel, SSF reprezintă o strategie bună pentru creșterea vitezei globale de transformare a celulozei în etanol. SSF dă randamente ridicate în etanol, fiind necesare cantități scăzute de enzime, deoarece inhibarea produsului final din celobioză și glucoză formată în timpul hidrolizei enzimatică este ușurată de fermentația drojdiei. Oricum, nu este posibil ca SSF să întâlnească toate schimbările la nivel industrial datorită vitezei scăzute de hidroliză a celulozei și a majorității microorganismelor angajate în fermentarea etanolului, nu se pot utiliza toate zaharurile obținute după hidroliză. Pentru a învinge această problemă, cocktailul enzimelor celulolitice ar trebui să fie mai stabil din punct de vedere al pH-ului și al temperaturii. Astfel, microorganismele folosite la fermentare (drojdii sau bacterii) trebuie să fie capabile să fermenteze un domeniu larg de zaharuri C_5 și C_6 .

Tulpinile recombinante de *E. coli* K011, *Klebsiella oxytoca*, și *Zymomonas mobilis* se pot folosi la obținerea cu randamente bune a etanolului. Procesul SSF a fost îmbunătățit după includerea co-fermentării multiplelor substraturi de zaharide prezente în hidrolizat. Această nouă variantă a SSF este cunoscută ca zaharificare și co-fermentare simultană (SSCF). Acestea 2 sunt preferate mai mult decât SHF, deoarece ambele pot fi efectuate în același tanc (reactor), cost redus, randament ridicat în etanol și timp scurt de procesare [21].

III.2.6.3. Cofermentarea hexozelor și pentozelor (SSCF)

Cofermentarea hexozelor și pentozelor (SSCF) este un procedeu extrem de promițător, care la ora actuală funcționează doar la scală de pilot. Pentru diminuarea formării inhibitorilor se folosește cofermentarea în același reactor a zaharidelor din celuloză și hemiceluloză la etanol. Acest proces SSCF se desfășoară într-o serie continuă de fermentatoare anaerobe (figura III.8).

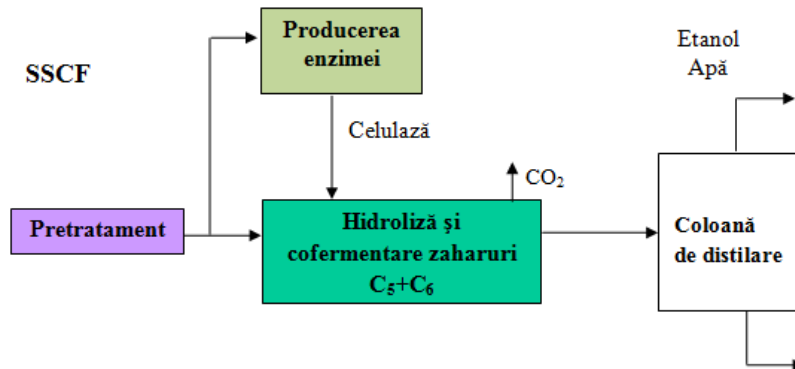


Figura III.8. Reprezentarea schematică a etapelor tehnologice în procesul de cofermentare a hexozelor și pentozelor (SSCF) [6], [9], [140]

Cofermentarea diverselor substraturi de zaharide s-a realizat la Iogen/Petro, Ottawa (Canada), printr-un procedeu în care zaharificarea și fermentarea au loc simultan, sub acțiunea combinată a celulazelor și microorganismelor. În acest fel, are loc transformarea monozaharidelor, imediat după eliberare, în etanol.

III.2.6.4. Procedeu de bioprocésare consolidată (CBP)

Cea mai avansată metodă de conversie a biomasei la etanol este bioprocésarea (CBP) – în care obținerea celulozei, hidroliza și fermentația celulozei au loc într-o singură etapă. Are capacitatea de a furniza costuri mai scăzute pentru transformarea biologică a biomasei celulozice la etanol cu viteză mare și randamente satisfăcătoare [21].

În acest procedeu pentru prepararea etanolului toate enzimele sunt produse într-un reactor de către un singur tip de microorganisme (Figura III.9). Această variantă reprezintă forma finală în evoluția tehnologiei de conversie a biomasei. Avantajele principale ale acestui procedeu sunt: costul de producție scăzut, reducerea diversității substratului enzimatic și compatibilitatea enzimelor cu sistemele de fermentare. Deocamdată nu sunt disponibile organisme sau combinații de microorganisme capabile să producă celulaze sau alte tipuri de enzime în cantități suficiente pentru obținerea unui randament bun de etanol.

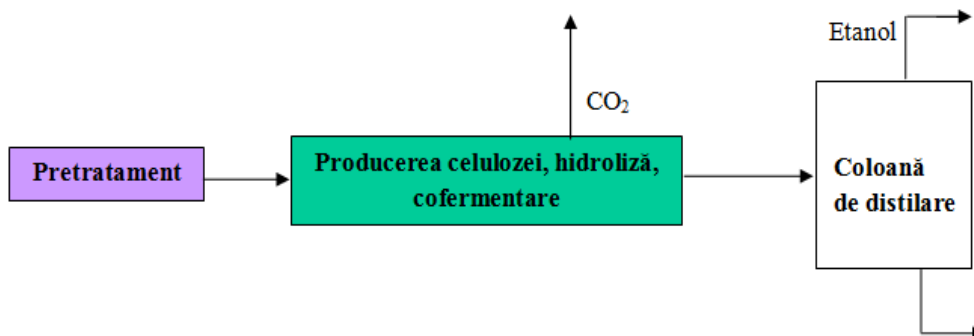


Figura III.9. Reprezentarea schematică a procedurii de bioprocésare consolidată[21]

III.2.6.5. Transformarea microbială directă (DMC)

DMC este o metodă de convertire a biomasei celulozice la etanol în care și etanolul și enzimele sunt produse de un singur microorganism. Principalul avantaj al DMC este faptul că nu este necesară o etapă dedicată producției celulozelor. Producerea celulozelor contribuie semnificativ la costul procesului de hidroliză enzimatică. Oricum, DMC nu este guvernatorul procesului alternativ, aceasta deoarece nu există organisme sănătoase disponibile să producă celuloze sau alte enzime cu pereți celulari degradați împreună cu etanol cu randament ridicat.

Au fost identificate câteva specii de *Fusarium oxysporum* care au capacitatea de a converti nu doar D-xiloza ci și celuloza la etanol, într-o singură etapă a procesului. Comparativ cu alte microorganisme, *Fusarium oxysporum* prezintă câteva caracteristici deosebite: avantajul obținerii in situ a celulozei și fermentarea celulozei, a pentozei și toleranța zaharului la etanol. Principalul dezavantaj al *F. oxysporum* este viteza scăzută de transformare a zaharului la etanol comparativ cu drojdia [21].

III.3. Descrierea procesului enzimatic**III.3.1. Pretratarea materiei prime**

Pretratarea materiei prime în două etape, urmată de hidroliza enzimatică, reprezintă soluția pentru înlăturarea dezavantajelor care apar în cazul unei singure hidrolize acide, în condiții severe. Acțiunea specifică a acestor enzime determină o reducere a cantității produșilor de degradare formați și o îmbunătățire a randamentului de glucoză. Scindarea fibrelor în cadrul etapei de pretratare are loc cu o cantitate relativ mică de reactivi, facilitând hidroliza celulozei prin scăderea cantității necesare de acid și implicit, prin diminuarea cantității de produși de degradare.

III.3.2. Spălarea substratului și a hidrolizatului

Produșii de degradare ai hexozelor și pentozelor (furfural și hidroxi-metil furfural, acizi) formați în etapa de pretratare sau hidroliză acidă au o acțiune toxică sau inhibitorie asupra hidrolizei enzimatice sau fermentării și trebuie îndepărtați sau neutralizați înainte de fermentare. Frația solidă provenită din etapa de pretratare se presează și se spală pentru îndepărtarea inhibitorilor. Opțional, în fracția lichidă se introduc schimbători de ioni pentru a limita formarea hidroxidului de calciu. Pentru a spori eficiența economică a procesului de pretratare sau hidroliză cu acid concentrat, are loc o reconcentrare a acidului recuperat prin mai multe etape de evaporare și reciclare. La pretratarea prin hidroliză cu acid diluat însă, recuperarea acidului s-a dovedit a fi mult prea costisitoare, comparativ cu neutralizarea și evacuarea. Acidul rămas este neutralizat cu oxid de calciu sau Ca(OH)_2 . Se obține gips hidratat ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) care se poate separa cu ușurință din hidrolizat. Este inert și nu influențează fermentarea și distilarea. Reciclarea acidului determină o micșorare a cantității de gips formată, de la 0.6-0.9 la 0.02 kg gips/kg de materie primă [6].

III.3.3. Hidroliză enzimatică

În această etapă, substratul este amestecat cu apă, în proporție de 5-12%, după care se adaugă enzimele celololitice. Hidroliza se desfășoară într-un interval de 24-150 ore, la $t = 50^{\circ}\text{C}$ și $\text{pH} = 5$. La sfârșitul hidrolizei, în soluție se găsește glucoza, iar în suspensie rămân celuloza, lignina și alți compuși insolubili. Soluția de glucoză se recuperează prin filtrarea și spălarea fibrelor solide pentru a crește randamentul. Apoi, este supusă fermentării, sub acțiunea drojdiilor, iar etanolul obținut este distilat. Procedeele de fermentație alcoolică și recuperare sunt bine stabilite. Înainte de fermentare, hidrolizatul este condiționat pentru îndepărtarea coprodușilor formați în timpul etapei de pretratare (furfural, acid acetic). Fermentarea durează aproximativ 7 zile, după care amestecul obținut de la fermentare este distilat și deshidratat, pentru recuperarea etanolului. Din reziduu solid, prin ardere se obține căldură și electricitate [140]. În bioreactor se introduce amoniac pentru controlul pH-ului și pentru a asigura azotul necesar microorganismelor fermentatoare.

S-a demonstrat că volumul de celulaze are un rol extrem de important în procesul de obținere a etanolului. Astfel, diminuarea cantității de celulaze introduse în sistem determină o scădere a volumului de glucoză produsă. Reducerea cantității de enzime influențează productivitatea procesului, prin creșterea duratei hidrolizei enzimatică [140].

O comparație între hidroliza enzimatică și hidroliza acidă a biomasei lignocelulozice este prezentată în tabelul III.2. [7], [141].

Tabelul III.2. Comparație între hidroliza acidă și hidroliza enzimatică a biomasei lignocelulozice

Hidroliza acidă	Hidroliza enzimatică
Nu se folosesc catalizatori specifici, ca urmare hidroliza celulozei va fi urmată de delignificare	Catalizatorii macromoleculari specifici necesită o pretratere a biomasei pentru a facilita acțiunea celulelor
Descompunerea hemicelulozei în compuși inhibitori (furfural)	Amestecul de zaharide obținut după hidroliza enzimatică poate fi introdus în etapa de fermentare anaerobă
Condițiile de reacție severe determină o creștere a costurilor de operare (energetice și echipamente speciale)	Condiții de reacție blânde (50°C , presiune atmosferică, $\text{pH}=4,8$)
Recuperarea și reutilizarea acidului	Costurile ridicate ale celulelor necesită reciclare
Viteză de hidroliză, mare	Viteză de hidroliză, scăzută
Randamentul global al glucozei este scăzut datorită reacțiilor de degradare	Randamentul ridicat al glucozei, funcție de sistemul enzimatic și etapa de pretratere aleasă

III.4. Degradarea celulozei cu microorganisme din rumen

În rumen microorganismele reprezintă circa 3,6% din volumul lichidului filtrat, dintre care 50% sunt protozoare. Pentru că dimensiunile bacteriilor sunt foarte mici, rezultă că acestea se găsesc numeric într-o proporție mult mai mare decât protozoarele, putând depăși 1010/ml de conținut rumenal. Bacteriile sunt reprezentate de aproximativ 200 specii.

Animalele ierbivore utilizează ca sursă de hrană substanțe organice provenite de la plante. Substanța organică vegetală este constituită din numeroase polizaharide complexe (celuloze, hemiceluloze, pectine, amidon), care sunt biodegradate de enzimele microorganismelor rezistente în aceste animale.

La ierbivorele rumegătoare (bovine, ovine, caprine etc.) sistemul digestiv este pluri-compartimentat în rumen (burduf), reticul (ciur) și omasum (foios). În rumen are loc digestia celulozei, hemicelulozei, heptinelor și amidonului sub acțiunea unor microorganisme specifice. Rumenul la bovine are o capacitate de circa 100 litri (la o greutate corporală de 500 kg) și conține 30-50% litri de lichid supus fermentației. La ovine are o capacitate de 5-6 litri (la o greutate de închegator), care conține glande gastrice pentru digestia adevărată, duodenul, intestinul subțire și gros.

Microorganismele din rumen sunt reprezentate prin **bacterii**: *Bacteroides* (amidogenes, amylophilus, ruminicola succinogenes), *Butyrivibrio* (fibrosolvens), *Clostridium* (lochheadii), *Lachnopsis* (fibrisolvens, multiparus), *Methanobacterium* (ruminantium), *Peptostreptococcus* (elsedernii) *Ruminococcus* (albus, flavofaciens), *Selomonas* (ruminantium), *Streptococcus* (bovis), *Succinogenes* (amilolytica), *Succinivibrio* (dextronosolvens), *Methanobrevibacter* (ruminantium), *Metanosarcina* (barkeri), *Anaerovibrio* (lypolitica), *Veillonella* (gazogenes) și **protozoare**: *Buetschia* (parva), *Charomina* (sin *Blepharocoris* bovis) (equi, ventriculi), *Dasytrycha* (kukuokensis, ruminantium), *Diplodinium* sp., *Emtodinium* sp., *Isotricha* (intestinalis, prostoma), *Metadinium* sp., *Parabundelia* (ruminantium), *Polymastigotes* sp., *Polyplastron* (multivesiculatum), *Prosomatida* sp., *Ophryoscolex* sp., *Trichostomatina* sp. [142].

Activitatea bacteriilor este celulolitică (*Bacteroides* sp, *Ruminococcus* sp.), amilolitică (*Selomonas* sp.) și proteolitică (*Veillonella* sp.). Protozoarele sunt capabile să metabolizeze celuloza (*Polyplastron multivesiculatum*), amidonul, pectinele, hemiceluloza și glucidele. Rumenul se comportă ca un adevărat fermentator viu în care microorganismele, în condiții anaerobe transformă substanțele organice vegetale în produși finali necesari nutriției, atât a gazdei, cât și a microorganismelor. Lichidul ruminal are pH= 5,5 și exercită efectul tampon prin soluția salină diluată de NaHCO₂ și fosfat de Na (fluxul continuu de salivă este la bovine de 60 l/zi).

Degradarea celulozei din rumen, în ciuda simplității sale structurale aparente, este destul de variabilă în raport cu alți polimeri din peretele celular, cum ar fi hemicelulozele și ligninele. O mare parte din această variabilitate poate fi atribuită factorilor fizici cum ar fi cristalinitatea sau asocierea cu alți polimeri cum ar fi lignina. În plus derivatizarea carbohidraților cu substituenți care restricționează degradarea poate avea de asemenea un rol important în alterarea degradării.

De exemplu, s-a arătat că xilanii sunt esterificați cu acizi ferulic și cumaric, care sunt monomerii primari ai ligninei și s-a constatat că această esterificare inhibă degradarea xilanului. [143].

Celulaza care este o 3-1,4-gluco-4- glucohidrolază, cuprinde enzimele care hidrolizează legăturile din celulozele native, alterate sau substituite. Există o variație considerabilă în ceea ce privește susceptibilitatea diferitelor celuloze la hidroliză și capacitatea diferitelor celuloze de a hidroliza celulozele complexe. Degradarea enzimatică a complexului celulozic implică două mecanisme principale și anume:

- separarea moleculelor de celuloză;
- scindarea hidrolitică și fosforolitică a legăturilor β -1,4-glicozidice.

Cocci anaerobi sunt cei mai importanți agenți celololitici ai rumenului. Două specii de cocci celololitici, *Ruminococcus albus* și *Ruminococcus flavefaciens*, sunt bacteriile celololitice predominante, izolate din conținutul de rumen a cinci vaci hrănite cu cinci cantități diferite de microorganisme din rumen[144].

Ruminococcus albus și *Ruminococcus flavefaciens* sunt bacterii care degradează celuloza din rumen. *R.albus* se găsește în număr mai mare decât *R. flavefaciens* în rumenul oilor și al vacilor de lapte. Mai multe date au arătat faptul că *R.albus* se găsește în număr mai mare datorită producerii de către acesta a unor substanțe cum ar fi bacteriocinele. *Ruminococcus albus* este una dintre cele mai importante bacterii celololitice care se găsește în rumen. Ele se găsește alături de bacteriile *Ruminococcus flavefaciens* și bacteriile succinogene în proporții care variază în funcție de hrană. Cu o hrană de bună calitate pentru animale, ruminococii sunt predominanți în rumen iar *B.succinogenii* sunt mai răspândiți în furajele care sunt mai dificil de digerat. *R. flavefaciens* și *B. succinogenes* pot să fermenteze chiar și cele mai ordonate substraturi, cum ar fi de exemplu fibrele de bumbac iar în contrast, cele mai multe tulpini de *R. albus* pot să utilizeze doar substraturi în care celuloza este prezentă în forma cea mai dezordonată. Dintre toate bacteriile celololitice care se găsește în rumen, doar *R.albus* poate fi cultivată în mod regulat în medii sintetice pentru a produce cantități destul de mari de celuloze extracelulare. S-a demonstrat că și câteva tulpini de *R.flavefaciens* sunt capabile să producă o anumită cantitate de celuloză extracelulară [145].

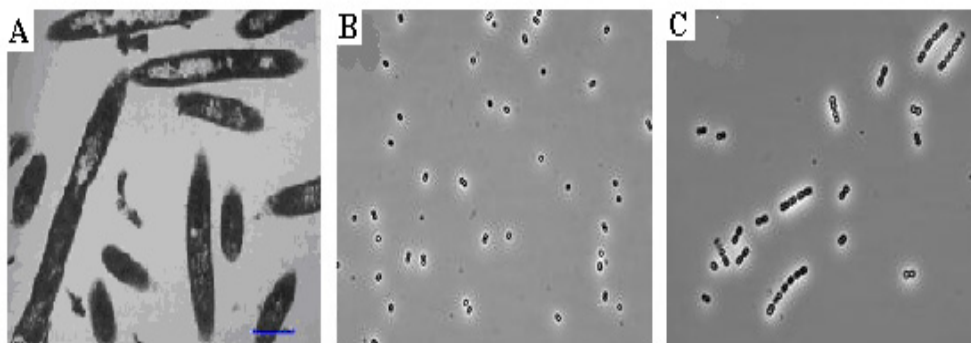


Figura III.10. A) *Butyrivibrio fibrisolvens*, B) *Ruminococcus albus* și C) *Ruminococcus flavefaciens*

În ultimii ani s-a arătat că suspensiile amestecului de microorganisme din rumen sunt capabile să degradeze xilanii la xiloză, arabinoză, xilobioză, xilotrioză, xilotetroză, xilopentoză și o serie de oligozaharide. Prin utilizarea unui mediu care conține xilan ca singură sursă de carbohidrat adăugată, au fost izolate tulpiniile bacteriilor active de fermentare a xilanului, lucru care coincide cu descrierea *Butyrivibrio fibrisolvens* [146].

Butyrivibrio fibrisolvens este o specie bacteriană care se găsește în tractul gastrointestinal al mamiferelor. Speciile au fost descrise cu ajutorul tulpinilor izolate din conținutul de rumen, tulpini care au fost găsite și în fecalele iepurilor, ale cailor, porcilor și ale oamenilor. Tulpinile de *B. fibrisolvens* sunt capabile să hidrolizeze saponinele, tributirina sau galactolipidele [147].

CAPITOLUL IV

Materiale și reactivi utilizați, mod de lucru

IV.1. Motivație, scop și obiective

Poluarea reprezintă o problemă socio-economică deosebit de importantă, întrucât provoacă schimbări climatice, distrugerea stratului de ozon, care influențează dezvoltarea durabilă a sistemului natural și socio-economic. Preocupările legate de schimbările climatice produse de poluare au impus stabilirea și adoptarea unor modalități privind reducerea emisiilor de gaze cu efect de seră[148].

Motivația acestui studiu îl reprezintă stabilizarea concentrațiilor gazelor cu efect de seră (ecosistemele să se poată adapta natural, producția alimentară să nu fie amenințată, dezvoltarea economică să se poată desfășura în mod durabil). Motivația producerii și utilizării bioetanolului din biomasa lignocelulozică este:

- evitarea încălzirii globale;
- reducerea gazelor cu efect de seră, până în anul 2020 cu 30% față de nivelurile înregistrate în 1990;
- protejarea resurselor limitate de combustibili clasici.

Datorită faptului că biomasa lignocelulozică reprezintă o sursă nepuizabilă de energie regenerabilă, materia primă pentru obținerea bioetanolului este extrem de variată și abundentă: deșeuri provenite din agricultură, silvicultură, hârtie uzată sau deșeuri municipale uzate. La producerea bioetanolului din biomasa lignocelulozică este necesară scindarea (hidroliza) chimică sau enzimatică a carbohidraților și fermentarea acestora cu ajutorul microorganismelor.

Etanolul celulozic este obținut din lignoceluloză, un material structural pentru marea majoritate a plantelor. Cele mai utilizate materii prime sunt: tulpinile de porumb, diverse tipuri de iarbă (*miscanthus*, *panicum*), resturi de lemn (crengi căzute, așchii). Compoziția chimică a etanolului celulozic este identică cu cea a etanolului obținut din alte surse: amidon din porumb, zaharoză, dar prezintă avantajul că lignoceluloza este mult mai abundentă și poate proveni din mai multe surse. Diferențele sunt date de introducerea etapelor necesare pentru a genera monomerii de zaharoză care pot fi disponibili pentru microorganismele tipice de producere a etanolului prin fermentare.

Biomasa lignocelulozică, o sursă, practic nelimitată și extrem de avantajoasă, de polizaharide fermentescibile: celuloză și hemiceluloze pentru obținerea biocombustibililor ecologici (bioetanol).

Principalul scop al tezei îl reprezintă studiul optimizării proceselor de pretratare și hidroliză enzimatică a biomasei lignocelulozice, pentru obținerea bioetanolului din a doua generație.

Cercetările abordate în teză au vizat în special pretratarea biomasei, întrucât această etapă este absolut esențială pentru obținerea bioetanolului, reprezentând aproximativ 30% din costul total al etanolului.

Alegerea metodei de pretratare influențează în mod semnificativ eficiența și configurația ulterioară a procesului tehnologic.

Obiectivul acestui studiu este eficientizarea procesului de solubilizare totală sau parțială a celulozei și hemicelulozei din trei tipuri diferite de biomasă: lemn esență tare, moale și biomasă de tip ierbos, prin designul, dezvoltarea și optimizarea unor metode inovative de pretratare (a microundelor, prin liofilizare și prin ultrasonare). De asemenea, s-au efectuat studii comparative asupra diferitelor procese fizice și fizico-chimice, în vederea eficientizării acestei etape, reducerea consumului de reactivi chimici.

Scopul acestei etape de pretratare este de a distruge sau îndepărta piedicile structurale și de compoziție ce pot fi implicate în procesul de hidroliză, precum și de a îmbunătăți viteza de hidroliză a enzimelor și de a mări randamentul de obținere a zaharurilor fermentabile din celuloză sau hemiceluloză. Pretratamentul alterează structura celulozică a biomasei pentru a facilita accesul enzimei la conversia carbohidraților polimeri în zaharuri fermentabile și de a facilita producția de microorganisme de către celulază. În etapa de pretratament trebuie să se urmărească atingerea următoarelor cerințe.

- îmbunătățirea formării zaharurilor sau a abilității obținerii ulterioare a zaharurilor prin hidroliză;
- evitarea degradării sau pierderii carbohidraților;
- evitarea formării subprodusilor ce pot inhiba hidroliza ulterioară și procesele de fermentare;
- eficiența costurilor.

Prin studii experimentale asupra mai multor tipuri de biomasă lignocelulozică (lemn esență moale, lemn esență tare și biomasă ierboasă) s-a demonstrat că metodele de pretratare abordate prezintă următoarele avantaje:

- utilizarea exclusivă a unor reactivi ieftini;
- procesul se desfășoară într-o singură etapă într-un interval de timp foarte scurt;
- randamentul ridicat de obținere a monozaharidelor (pentoze și hexoze) din lignoceluloză.
- s-a constatat că hidroliza enzimatică a biomasei pretratate astfel, decurge cu un randament superior unei probe pretratate printr-un procedeu obișnuit.
- elimină necesitatea utilizării de echipamente speciale, anticorozive;
- ca materie primă se pot folosi mai multe tipuri de materiale lignocelulozice: biomasă ierboasă, lemn de esență moale, lemn de esență tare, în aceleași condiții de reacție (cantitate de reactivi, timp de reacție, temperatură, presiune).

Un alt aspect ce este luat în considerare îl reprezintă hidroliza enzimatică. Cercetările desfășurate au urmărit atât studii în care au fost atinse metode convenționale cât și elaborarea și dezvoltarea unei metode inovatoare de hidroliză, în care s-a utilizat pentru prima dată un consorțiu de microorganisme complet nou. Rezultatele analizei comparative a demonstrat eficiența crescută a noului consorțiu microbial, randamentul obținut fiind mai bun decât în cadrul metodelor convenționale.

Astfel, obiectivele principale pentru atingerea scopului propus în cadrul tezei au fost:

- valorificarea superioară a deșeurilor lignocelulozice;
- protejarea resurselor alimentare;
- reducerea impactului asupra mediului prin protejarea biodiversității;
- analiza materialului lignocelulozic ca sursă de obținere a bioetanolului;
- studierea, testarea și caracterizarea fizico-chimică a materialelor lignoceluloze luate în studiu;
- elaborarea metodelor de analiză a deșeurilor celulozice și caracterizarea materiei prime;
- studiul optimizării proceselor de pretratament a biomasei lignocelulozice are ca efect diminuarea timpului de reacție și utilizarea unor cantități mai mici de reactivi, astfel eliminându-se formarea compușilor nedoriti, care afectează randamentul de obținere a bioetanolului;
- micșorarea cristalinității celulozei, pentru a favoriza biodegradarea enzimatică a substratului;
- hidroliză enzimatică.

Tema părții experimentale o reprezintă pretratamentul și hidroliza enzimatică a biomasei lignocelulozice, în vederea obținerii bioetanolului.

IV.2. Materiale și reactivi utilizați

Pentru determinarea activității celulei utilizate la hidroliza enzimatică s-au utilizat următorii reactivi: acid acetic glacial (Chimactiv S.R.L București), apă distilată, NaOH 50% (Chemapol), carboximetilcelulază CMC (Fluka), acid 3,5-dinitrosalicilic DNS (Merck), Tartrat de sodiu și potasiu (Merck), glucoză (Merck). Celulaza folosită este: Celluclast 1,5 L CCN 03116 (Novozyme).

Pentru analiza conținutului de hidrați de carbon s-au utilizat: Avicel (Fluka), rumeguș măcinat și uscat, apă, glucoză (Merck), xiloză (Merck), lactoză (Merck), acid 3,5-dinitrosalicilic DNS (Merck), fenol (Reactivul București), sulfat de sodiu (Fluka), NaOH 1% (Chemapol), acetonitril (Promochem).

Pentru pretratamentul stejarului s-au utilizat lichidele ionice tetrafluoroborat de 1-etil-3-metilimidazoliu (Merck), tetrafluoroborat de 1-hexil-3-metilimidazoliu (Merck), tetrafluoroborat de 3-octil-1-metilimidazoliu (Merck), hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu (Merck) și trifluoroacetat de 1-etil-3-metilimidazoliu (Merck), argon.

Pentru pretratamentul cu microunde, prin liofilizare și ultrasonare s-au utilizat H₂SO₄ 0,82% NaOH 1% sau HCl 1% (Merck) și apă ultrapură.

Pentru imobilizarea celulei prin metoda entrapării în sol-gel s-au utilizat: tetrametoxisilan TMOS 98% (Merck), feniltrimetoxisilan PhTMOS 99% (Fluka), metiltrimetoxisilan MeTMOS 98% (Merck), fluorură de sodiu, acid acetic glacial (Chimactiv S.R.L București), apă distilată, NaOH 50% (Chemapol), alcool izopropilic (Merck), hexan (Merck), tetrafluoroborat de 1-etil-3-metilimidazoliu (Merck).

IV.2.1. Achiziția enzimelor

Transformarea biomasei lignocelulozice în zaharuri fermentescibile este mult mai dificilă decât în cazul polizaharidelor de tip amidon. Ea depinde foarte mult de tipul biomasei și de tipul pretratamentului utilizat și caracteristicile complexului enzimatic care se folosește. Complexul enzimatic de celulază conține mai multe enzime, în special endoglucanaze și celobiohidrolaze, dar și β -glucozidaze. Endoglucanazele (EC 3.2.1.4) atacă suprafața microfibrilor de celuloză hidrolizând legăturile glicozidice astfel încât să rezulte lanțuri celulozice liniare, mai accesibile pentru degradarea ulterioară. Celobiohidrolazele (EC 3.2.1.91, care sunt numite și exoglucanaze) hidrolizează legăturile 1,4- β -D-glicozidice ale lanțurilor libere de celuloză și eliberează fie celobioza (dizaharida constituită din două molecule de β -D-glucoză legate 1,4), fie o celotetroză.

β -Glucozidazele (EC 3.2.1.21) sunt enzimele care hidrolizează celobioza la două molecule de glucoză. Asemenea sisteme celulozice sunt produse de fungiile din genul *Trichoderma*, în special *Trichoderma reesei*. Sistemul celulozic din *Trichoderma reesei* conține cel puțin cinci endoglucanaze, două celobiohidrolaze și două β -glucozidaze.

Conform informațiilor furnizate de compania producătoare, acest complex enzimatic este specific pentru biomasa lignocelulozică, pe care o poate hidroliza eficient la monozaharide fermentescibile. Are inclusiv activitate hemicelulozică. Activitatea endoglucanazică este standardizată pe baza acțiunii asupra carboximetilcelulozei (CMC), fiind de cel puțin 2,5 CMC unități/mg. O unitate CMC este definită prin eliberarea unui micromol de zaharuri reducătoare (exprimate ca glucoză), într-un minut, la 50°C și pH 4,8. Activitatea β -glucozidazică este exprimată în unități pNPG, fiind de cel puțin 0,4 unități/mg. O unitate pNPG este definită prin eliberarea unui micromol de p-nitrofenol prin hidroliza p-nitrofenil- β -D-glicopiranozidei în 10 minute, la temperatura de 50°C și pH 4,8. Producătorul recomandă o dozare a acestui complex enzimatic de 0,1-0,5 ml la 1 g celuloză sau de 0,05-0,25 ml la 1 g biomasă, în funcție de tipul biomasei, însă se precizează că dozarea optimă trebuie determinată pentru fiecare caz în parte.

Pentru caracterizarea enzimelor achiziționate, s-a determinat activitatea celulozică pe substrat de carboximetilceluloză.

IV.3. Determinarea activității celulelor achiziționate

IV.3.1. Prepararea reactivilor necesari

IV.3.1.1. Soluție tampon acetat de sodiu 0,05 M, pH=4,8

La 900 ml apă distilată se adaugă 2,85 ml acid acetic glacial. În timpul agitării magnetice se adaugă NaOH 50% până la pH=4,8. Se aduce la un volum total de 1 litru cu apă distilată.

IV.3.1.2. Soluție NaOH 10,67% (w/v)

Se dizolvă 32 g NaOH în 200 ml apă distilată. Se agită până la dizolvare și răcire. Se aduce la un volum de 300 ml cu apă distilată.

IV.3.1.3. Soluție substrat CMC 2%

La 100 ml soluție tampon acetat de sodiu se adaugă 2 g CMC. Se agită pentru o amestecare perfectă și se menține la 4°C cel puțin 1 oră înainte de utilizare. Soluția este stabilă 3 zile la 4°C.

IV.3.1.4. Soluție de acid 3,5-dinitrosalicilic (DNS) 1%

Se suspendă 10 g DNS în 1000 ml apă distilată și se adaugă treptat amestecând continuu 150 ml soluție NaOH 10,67%. Suspensia se încălzește pe baia de apă la 50°C (122 F) până devine limpede. Temperatura în baia de apă nu trebuie să depășească 50°C.

La soluția de mai sus se adaugă treptat 300 g tartrat de sodiu și potasiu (tetrahidrat) amestecând continuu. Soluția este diluată cu apă distilată la un volum de 1000 ml și se filtrează pe un filtru cu frită de sticlă. Se păstrează într-o sticlă de culoare închisă la temperatura camerei.

IV.3.1.5. Soluții standard de glucoză

Se prepară o soluție de glucoză 2 mg/ml tampon acetat 0,05 M, pH=4,8 (1,0 mg/0,5 ml). Din această soluție se iau câte:

- 1 ml peste care se adaugă 0,5, 1,0 și 3,0 ml soluție tampon acetat 0,05 M, pH=4,8
- 1,0 ml soluție de glucoză 2 mg/ml + 0,5 ml tampon acetat 0,05 M, pH 4,8 =1:1,5
= 1,33 mg/ml (0,67 mg/0,5 ml)
- 1,0 ml soluție de glucoză 2 mg/ml + 1,0 ml tampon acetat 0,05 M, pH 4,8 =1:2
=1,0 mg/ml (0,5 mg/0,5 ml)
- 1,0 ml soluție de glucoză 2 mg/ml + 3,0 ml tampon acetat 0,05 M, pH 4,8 =1:4
=0,5 mg/ml (0,25 mg/0,5 ml)

IV.3.1.6. Soluția de celulază

Se lucrează cu soluțiile de celulaze achiziționate, care se diluează cu soluție tampon acetat de pH=4,8 astfel ca extincțiile citite să se regăsească în intervalul în care s-a efectuat etalonarea cu soluțiile de glucoză.

IV.3.2. Determinarea activității celulazei

Mod de lucru

Modul de lucru schematic este prezentat în tabelul 1. Se pipetează în eprubeta cu probă 0,5 ml soluție de celulază și se incubează 2 minute la 50°C, după care se pipetează 0,5 ml soluție substrat atât în eprubeta cu probă cât și în celelalte eprubete. Se incubează proba 30 minute la 50°C, după care se adaugă câte 3 ml soluție de DNS 1% în fiecare eprubetă.

În continuare se pipetează:

- 0,5 ml soluție tampon acetat în eprubeta cu blanc;
- 0,5 ml soluție de celulază în eprubeta cu martorul;
- 0,5 ml soluție standard de glucoză în eprubeta cu soluție de etalon de glucoză.

Toate eprubetele se pun la fiert 5 minute pe baia de apă pentru dezactivarea enzimei și formarea culorii, apoi se răcesc sub un curent de apă și se adaugă în fiecare eprubetă câte 20 ml apă distilată. Modul de lucru schematic al determinării activității celulazei este prezentat în tabelul IV.1.

Tabelul IV.1. Mod de lucru schematic al determinării activității celulei

Reactivi	Probă	Martor	Glucoză	Blanc
Soluție celuloză (ml)	0,5	-	-	-
Incubare 2 minute la 50°C				
Soluție substrat CMC 2%	0,5	0,5	0,5	0,5
Incubare 30 minute la 50°C				
Soluție DNS 1% (ml)	3	3	3	3
Soluție tampon acetat de sodiu 0,05 M, pH=4,8 (ml)	-	-	-	0,5
Soluție celuloză (ml)	-	0,5	-	-
Soluție standard de glucoză (ml)	-	-	0,5	-
Fierbere 5 minute				
Apă distilată (ml)	20	20	20	20

Proba, martorul și standardele de glucoză se spectrofotometrează la 540 nm, citirea făcându-se față de blanc. În cazul standardelor de glucoză se face o determinare pentru fiecare concentrație de glucoză (în cazul nostru se analizează așadar patru standarde). Toate probele se fac în duplicat. Dacă diferența dintre valorile citite ale extincțiilor este mai mică decât 3% se face media rezultatelor obținute, dacă este mai mare, se repetă analiza.

Se face reprezentarea grafică a extincției standardelor de glucoză în funcție de cantitatea de glucoză. Această reprezentare (Figura IV.1) este de forma unei drepte având ecuația:

$$E = a + b * C_G \quad (IV.1.)$$

unde:

- E = extincția
- C_G = cantitatea de glucoză, mg/ml
- a = ordonata la origine
- b = panta dreptei

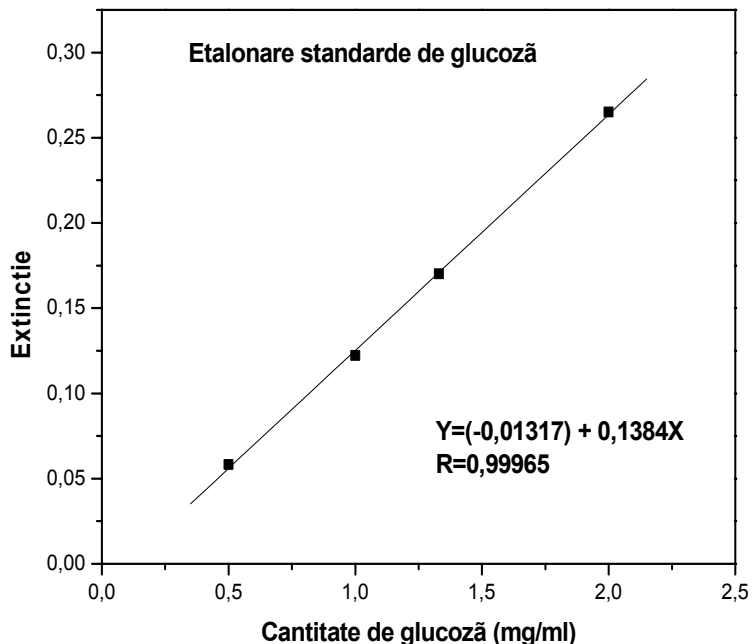


Figura IV.1. Etalonare standarde de glucoză

Cantitatea de glucoză eliberată din probă se calculează cu formula:

$$C_G = \frac{(E_P - E_M) - a}{b} \text{ [mg glucoză / ml]} \quad (\text{IV.2.})$$

Activitatea celulazei se calculează în raport cu glucoza eliberată prin hidroliza carboximetilcelulozei și se exprimă în unități. O unitate reprezintă cantitatea de enzimă aflată într-un ml soluție de enzimă care pune în libertate 1 μmol zaharuri reducătoare (exprimate ca glucoză) într-un minut, la 50°C și pH=4,8. Cantitatea de glucoză eliberată se calculează (în mg) pe baza etalonării.

Formula de calcul a activității este:

$$A_{CMC} = \frac{\text{mg glucoză eliberată} \cdot 1000}{180 \cdot 0,5 \cdot 30} \cdot \text{dilutia} \text{ [U / ml]} \quad (\text{IV.3.})$$

Rezultatele activității

Pentru caracterizarea enzimelor utilizate la hidroliza enzimatică, s-a determinat activitatea celulazică pe substrat de carboximetilceluloză. Au fost realizate determinări la mai multe diluții ale soluției de enzimă, deoarece activitatea depinde și de raportul enzimă/substrat. Rezultatele sunt centralizate în tabelul IV.2.

Tabelul IV.2. Activitatea unor soluții de enzimă

Tipul enzimei	Glucoză eliberată în 30 minute mg/ml	Caracteristici		Activitatea CMC U/ml
		Diluție sol. enzimă	Raport enzimă/substrat ml/g	
Accelerase 1000	2,41	1:40	1,25	35,7
Accelerase 1000	2,39	1:80	0,625	71,0
Accelerase 1000	2,40	1:100	0,5	88,9
Celluclast 1.5L	2,07	1:40	1,25	30,7
Celluclast 1.5L	2,36	1:80	0,625	70,1
Celluclast 1.5L	2,25	1:100	0,5	83,1
Celluclast 1.5L	1,13	1:200*	0,25	83,7
Celluclast 1.5L	0,25	1:1000*	0,05	92,1

* s-au realizat prin diluarea soluției de la diluția de 1:100, înainte de citirea extincției

Se observă că s-a determinat aproximativ aceeași cantitate de glucoză eliberată, chiar dacă diluția enzimei introdusă în reacție a fost mărită de la 1:40 la 1:100. Probabil apare un fenomen de inhibiție sau saturare, ceea ce înseamnă că trebuie să se lucreze cu soluții mai diluate. Diluarea soluției înainte de citire de 2, respectiv 10 ori nu a dus la modificări semnificative ale activităților obținute. Așadar, pentru a avea rezultate corecte, sistemul de analiză trebuie astfel setat încât cantitatea de glucoză eliberată în 30 de minute să fie în intervalul 1-2 mg/ml.

În consecință, valorile activităților pentru cele două enzime care vor fi considerate de referință pentru activitatea endoglucozidică sunt 88,9 CMC U/ml pentru Accelerase, 1000 și 83,1 CMC U/ml pentru Celluclast 1.5L. Se observă că aceste valori sunt apropiate, așadar ambele enzime pot fi utilizate pentru hidroliza biomasei. Diferențierea între ele se face pe baza altor caracteristici, cum ar fi activitatea β-glucozidică sau hemicelulazică, respectiv rezistența la inhibiția cauzată de alți compuși prezenți în sistem.

Concluzii parțiale:

- Pentru determinarea activității celulelor au fost realizate determinări la mai multe diluții ale soluției de enzimă, deoarece activitatea depinde și de raportul enzimă/substrat;
- Pentru caracterizarea enzimelor achiziționate, s-a determinat activitatea celulazică pe substrat de carboximetilceluloză;
- Au fost elaborate metodele de analiză chimică și cromatografică pentru determinarea cantitativă a zaharurilor totale, respectiv a glucozei și xilozei din hidrolizatele celulozice.

CAPITOLUL V

Caracterizarea fizico-chimică a materiei prime

Biomasa lignocelulozică care se va supune pretratării a fost supusă înainte unei etape preliminare de îndepărtare a impurităților (materiale nelemnoase, metale, pietre, pământ, sticlă, plastic, etc.).

Biomasa lignocelulozică este supusă etapei preliminare de îndepărtare a impurităților ce constă în mărunțirea cu ajutorul unei mori destinate măcinării deșeurilor rezultate din procese diferite și a părților rebutate în vederea reciclării. Deșeurile rezultate din procesul de producție pot fi frunze, crengi, bucăți de lemn sau materiale termoplastice: polietilena de joasă și înaltă presiune, PVC, ABS, poliamidă, etc.

Caracteristicile tehnice ale morii de mărunțire sunt : turația rotorului-227 rot/min; nr.de corp rotor- 15 buc; nr. de cuțite fixe-4 buc; nr. de cuțite pe rotor-45 buc; dimensiunile camerei de măcinare-266x428x210 mm; dimensiunile bunzarului de alimentare-430x500x900 mm; productivitate-50 ÷ 70 kg/h; puterea motorului-4 kW; nivelul de zgomot maxim admis la funcționarea în gol- 45 dB; tensiunea de alimentare/frecvența-380/50 V/Hz.

Probele de biomasă lignocelulozică au fost pregătite mecanic, după care au urmat analize preliminare de caracterizare : umiditatea, conținutul de solide totale , determinarea conținutului de carbon organic total, analiza calitativă prin spectroscopia FT-IR, microscopia electronică de baleiaj SEM – EDAX și concentrația metalelor.

Granulația are un rol important astfel încât, cu cât suprafața specifică este mai mare cu atât va crește cantitatea de enzimă adsorbită și implicit va crește și gradul de zaharificare.

Metodele standard de pretratare includ tratamente mecanice și fizice pentru curățarea, mărunțirea biomasei și distrugerea structurii celulare, pentru a facilita tratamentele chimice și biologice ulterioare. Mărunțirea biomasei facilitează accesul enzimelor, aburilor. Dimensiunea ideală variază de la câțiva centimetri până la 1-3 mm³.

V.1. Umiditatea biomasei lemnoase

Umiditatea limită a biomasei lignocelulozice nu trebuie să depășească 40% din masă. Umiditatea este o proprietate a biomasei foarte importantă, de care depinde proiectarea instalației și desfășurarea întregului proces de obținere a bioetanolului.

O probă cu masă de 10 g de biomasă (brad, plop, stejar, salcâm și cânepă) a fost uscată într-o etuvă la o temperatură de 115 ± 2°C, timp de 2 ore. Această operațiune s-a efectuat până când s-a obținut o masă constantă.

Procentul de umiditate se calculează pe baza pierderii de masă a probei. Proba uscată a fost cântărită cât timp a fost fierbinte, parametru important care trebuie compensat pentru cazurile în care se solicită o precizie ridicată. Procentul de umiditate din biomasă se determină cu relația următoare :

$$\%umiditatea = \left(1 - \frac{\text{greutatea probei uscate}}{\text{greutatea probei cantarita initial}} \right) * 100$$

(V.1.)

Umiditatea biomasei lemnoase este prezentată figura V.1. și constituie un parametru important în etapa de pretratare. Cu cât umiditatea este mai mare cu atât puterea calorică este mai mică.

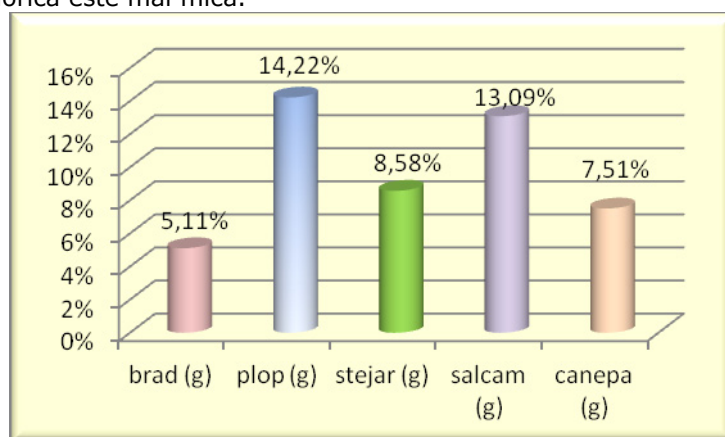


Figura V.1. Reprezentarea grafică a umidității în funcție de tipul biomasei lemnoase

V.2. Conținutul de solide totale

Conținutul de solide totale din biomasă reprezintă cantitatea de solide rămasă după ce toate componentele volatile au fost îndepărtate prin încălzirea probei la 105°C până la masă constantă. Pe de altă parte, conținutul de umiditate al probei reprezintă o măsură a cantității de apă (și a altor compuși volatili la 105°C) prezentă în astfel de probe[149].

Determinarea conținutului total de solide din biomasă se calculează cu ajutorul formulei de mai jos:

$$\%total\ solide = \left(\frac{\text{greutatea probei uscate}}{\text{greutatea probei cantarita initial}} \right) * 100$$

(V.2.)

Caracterizarea fiecărui tip de biomasă folosită, din punct de vedere al umidității și conținutului total de solide, sunt prezentate în tabelul V.1.

Tabelul V.1. Caracterizarea biomasei

Tip biomasă	% total solide	% umiditate
Brad	94.89	5.11
Plop	85.78	14.22
Stejar	91.42	8.58
Salcâm	86.91	13.09
Câneapă	92.19	7.51

V.3. Determinarea carbonului organic total

Determinarea conținutului de carbon total din probele de bioasă lignocelulozică s-a realizat cu ajutorul analizorului de carbon și azot total TOC - V_{CPH} (SHIMADZU – Japonia), dotat cu autosampler prevăzut cu 94 de poziții (proces automatizat de prelevare/injectare) și posibilitate de decontaminare a acului între două determinări care se face atât la suprafața exterioară cât și pe interiorul acului și software specializat de achiziție și prelucrare a datelor. Metoda de determinare - oxidare catalitică/ detecție NDIR, limita minimă de detecție - 50 ppb, timp de determinare - aprox. 3 min, acuratețea măsurătorii: 1,5 %.

- sistem pentru determinarea azotului total TN: metoda de determinare – chemiluminiscență, cu analiza simultană TOC/TN (domeniu de măsură cuprins între 0-4000 mg/l, limita de detecție - 50ppb, acuratețe - 3%, timp de determinare - cca. 4 min.)

- sistem pentru analiza carbonului purjabil POC

- sistem de analiză pentru probe solide bazat pe principiul de analiză pentru TC- combustie catalitică la temperaturi ridicate, principiu de analiză pentru IC - acidifiere la cca. 200°C, detector – IR, domeniu de măsură: 0,1 - 30 mg C absolut pentru TC și IC.

Materiale determinate: probe de rumeguș (0.301 g), cântărite pe o balanță analitică Sartorius cu precizie de ± 0.0001 g. Substanțe: acid fosforic, 1:1 v / v (Merck).

Determinarea carbonului organic total se determină cu ajutorul următoarei ecuații:

$$TOC = TC - IC$$

(V.3.)

unde:

TOC - carbon organic total

TC - carbon total

IC - carbon anorganic

Valorile carbonului organic total și a carbonului anorganic obținute în urma analizei biomasei lignocelulozice se regăsesc în tabelele V.2. și V.3

Tabelul V.2. Rezultatele determinării conținutului de carbon total (TC) din probele analizate

Probă	TC (mg)	greutatea (mg)
Câneapă	11.56	0.02560
Salcâm	14.756	0.03040
Stejar	8.484	0.02470
Brad	14.48	0.02980

Tabelul V.3. Rezultatele determinării conținutului de carbon anorganic (IC) din probele analizate

Probă	IC (mg)	greutatea (mg)
Câneapă	0.03785	0.02230
Salcâm	0.02117	0.02390
Stejar	0.01730	0.02230
Brad	0.02396	0.02440

Rezultatele determinării conținutului de carbon total din probele de bioasă lignocelulozică sunt prezentate în tabelul V.4. de unde se observă că valoarea cea mai mare a carbonului organic total se află în cazul probei de salcâm[150].

Tabelul V.4. Valorile carbonului organic total din probele de rumeguș

Probă	TOC (mg)
Câneapă	11.52215
Salcâm	14.73483
Stejar	8.4667
Brad	14.45604

V.4. Analiza calitativă prin microscopie electronică de baleiaj/EDAX

Morfologia și compoziția elementară a biomasei lignocelulozice, a fost evidențiată în urma analizei calitative prin microscopie de baleiaj/EDAX, cu un microscop electronic de baleiaj Inspect S.

Probele de bioasă lignocelulozică nu au necesitat o prelucrare în prealabil și au fost analizate în condiții de lucru de vid preliminary[150].

Pentru determinarea conținutului din bioasă lignocelulozică am folosit analiza cantitativă (EDAX – spectrometrie cu dispersie după energie) a materialelor. Condiții de lucru: vacuum, tensiune înaltă (30KW), timp de colectare 100/s. Prelucrarea datelor s-a realizat prin colectare și cuantificare.

Figurile V.2. – V.9. prezintă morfologia și compoziția elementară a biomasei lignocelulozice, ce a fost evidențiată în urma analizei calitative prin microscopie electronică de baleiaj/EDAX.

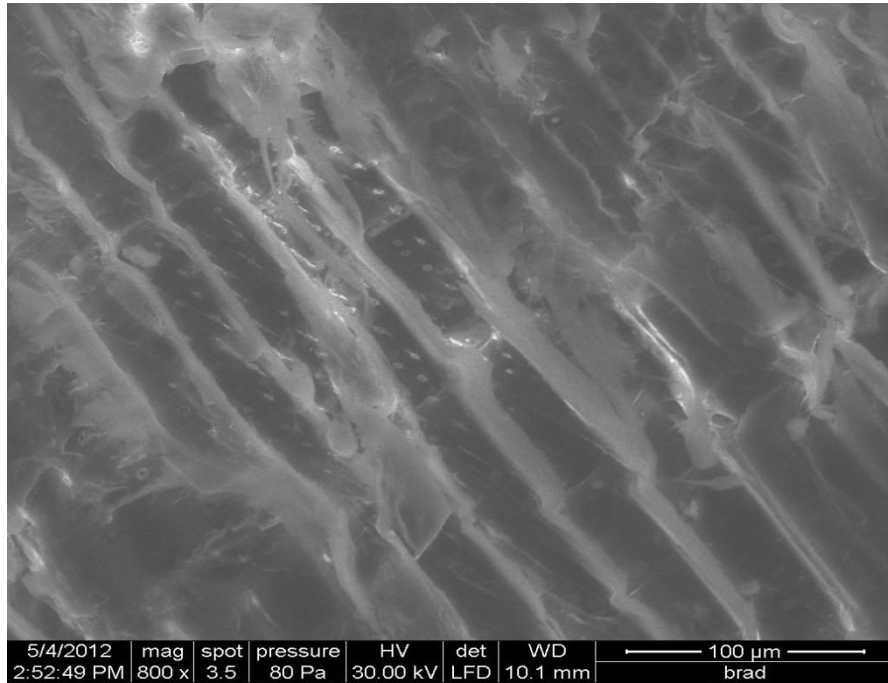


Figura V.2. Imagini SEM efectuate pentru biomasa netratată de brad

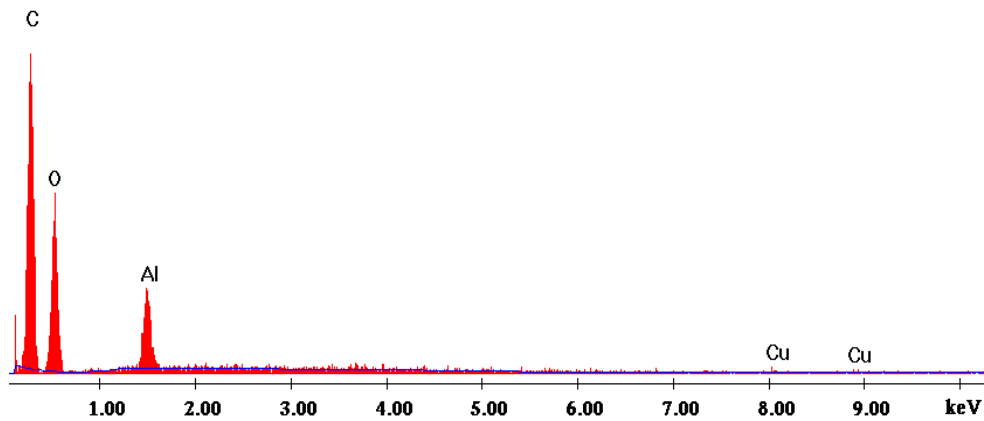


Figura V.3. Spectrele EDAX pentru biomasa netratată de brad

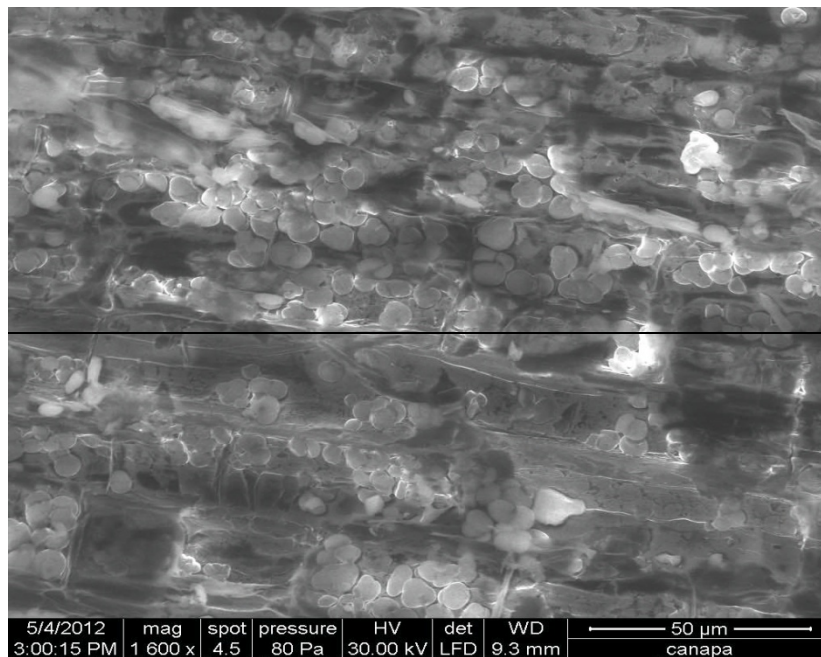


Figura V.4. Imagini SEM efectuate pentru biomasa netratată de cânepă

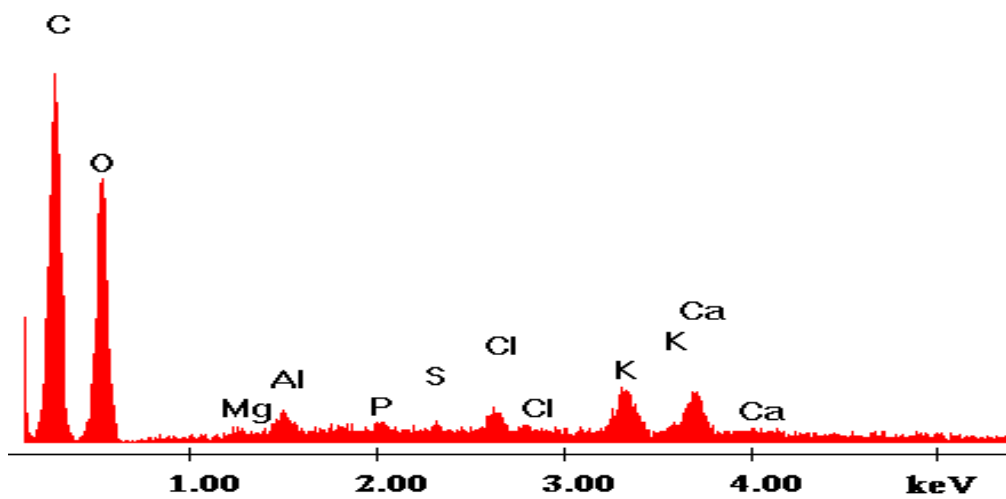


Figura V.5. Spectrele EDAX pentru biomasa netratată și pretrată de cânepă

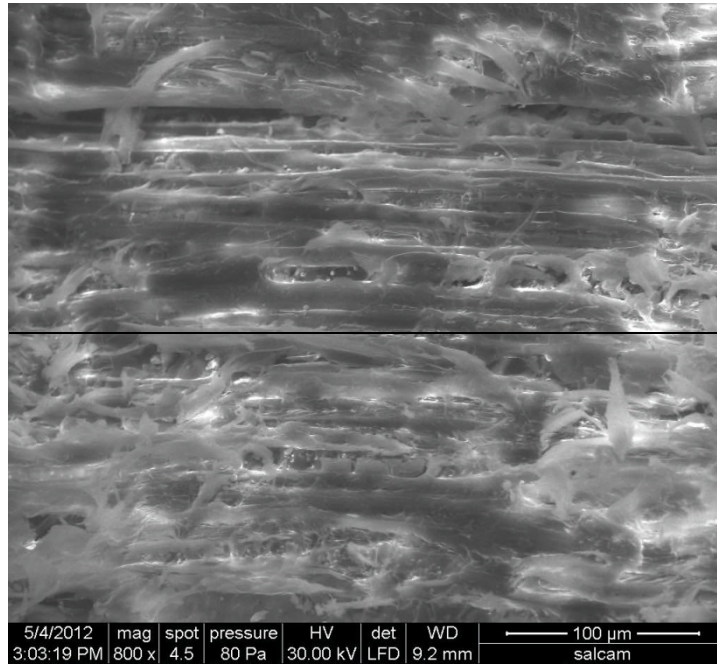


Figura V.6. Imagini SEM efectuate pentru biomasa netratată de salcâm

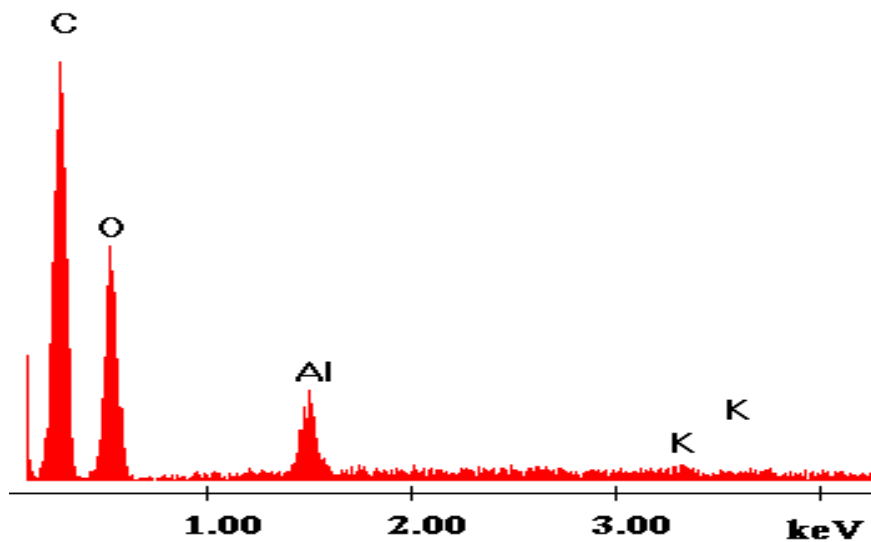


Figura V.7. Spectrele EDAX pentru biomasa netratată de salcâm

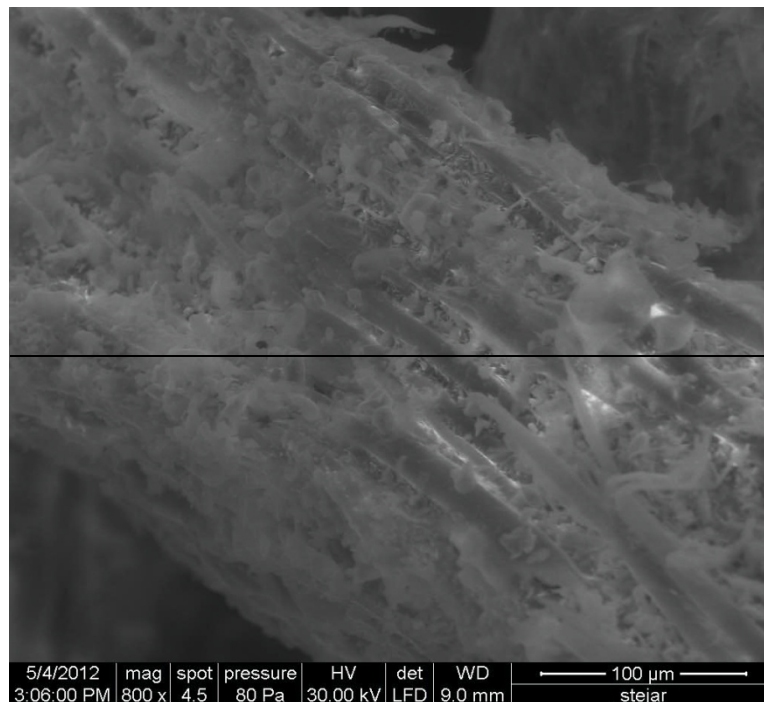


Figura V.8. Imagini SEM efectuate pentru biomasa netratată de stejar

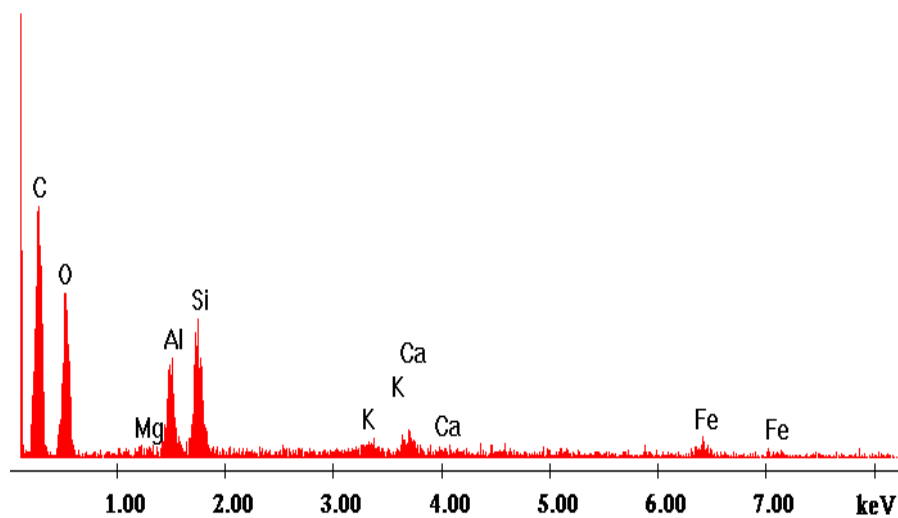


Figura V.9. Spectrele EDAX pentru analiză elementară a biomasei netratată de stejar

Morfologia și compoziția elementară a biomasei lignocelulozice diferă la cele patru probe de biomasă lignocelulozică.

Topografia suprafeței pentru biomasa lignocelulozică de brad, salcâm și stajar prezintă o structură fibroasă și rigidă față de proba de cânepă unde se observă o structură densă cu pulberi fine dispersate[149,150,151].

Din analiza elementară pe suprafață pentru toate probele luate în studiu se constată concentrații procentuale de masă ridicate pentru carbon și oxigen față de Al, K, Cl și Fe.

V.5. Spectroscopie de absorbție atomică

Spectroscopia de absorbție atomică s-a utilizat pentru determinarea concentrațiilor metalelor în biomasa lignocelulozică.

0.1 g de biomasă lignocelulozică a fost cântărită la balanța analitică cu precizie de $\pm 0,0001$ g.

Probele au fost tratate cu 5,0 ml HNO₃ 65% și supuse digestiei într-un cuptor cu microunde MWS 2 – Berghof, utilizând un program în trei trepte: T1=160 °C, t1=15 min, p1=80%, T2=210 °C, t2=15 min, p2=90% și T3 în scădere, t3=15 min, p3=0%. După digestie, probele se trec cantitativ în baloane cotate de 20 ml (se completează la semn cu apă ultrapură).

Concentrația metalelor se determină prin spectrofotometrie de absorbție atomică (AAS) conform standardului internațional ISO 15586:2003 (E), pe un aparat novAA 400 G – Analytik Jena, cu cuptor de grafit, prevăzut cu autosampler MPE60 și soft WinAAS 3.17.0 pentru controlul și prelucrarea datelor.

Probele de lignoceluloză au fost studiate prin spectroscopie de absorbție atomică pentru a pune în evidență eventuala prezență a metalelor, inclusiv metale grele (Zn, Pb, Cu, Fe, dar și de As). S-a constatat că distribuția metalelor variază de la o probă la alta și depinde și de locul de unde s-a prelevat proba din biomasă[149].

Rezultatele determinării concentrațiilor metalelor în biomasă se regăsesc în tabelul V.5.

Tabelul V.5. Concentrația metalelor în biomasa lignocelulozică

Tip biomasă lignocelulozică	Concentrație (ppm)				
	Cu	Zn	Pb	Fe	As
Biomasa de brad	1.34	3.87	0.03	0.06	*
Biomasa de stejar	1.22	5.44	0.35	0.21	*
Biomasa de cânepă	1.88	6.70	1.49	0.04	*
Biomasa de salcâm	2.06	2.57	0.20	0.02	*

* sub limita de detecție a aparatului

Analizând datele determinate, se constată că în toate probele Zn este în cantitatea cea mai mare, urmat de Cu și Pb.

Conform datelor din literatură, rezultatele obținute prin spectroscopie de absorbție atomică indică un conținut mediu de metale grele, comparativ cu valorile care sunt considerate „de risc”. În substratul de adsorbție prezența metalelor grele este nedorită, eliberarea lor fiind posibilă și lentă în timp.

V.6. Analiza calitativă prin spectroscopia FT-IR

Analiza calitativă prin spectroscopie de FT-IR a biomasei lignocelulozice a fost realizată cu un spectrometru FT-IR VERTEX 70, Bruker Germany. Probele au fost mojarate cu bromură de potasiu și făcute pastile, după care au fost analizate la numărul de undă cuprins între 4000-400 cm^{-1} .

Analiza prin spectroscopie de FT-IR ce a fost efectuată asupra probelor de biomasă lignocelulozică studiate (lemn esență tare, moale și de tip ierbos), după etapa preliminară de pregătire mecanică sunt prezentate în următoarele figuri V.10.-V.13

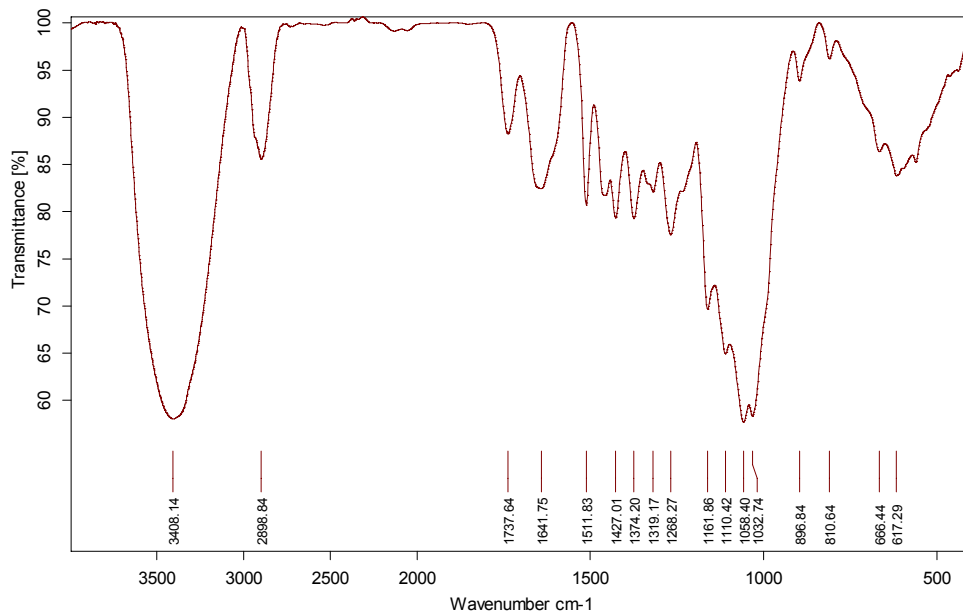


Figura V.10. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru biomasă netratată de brad

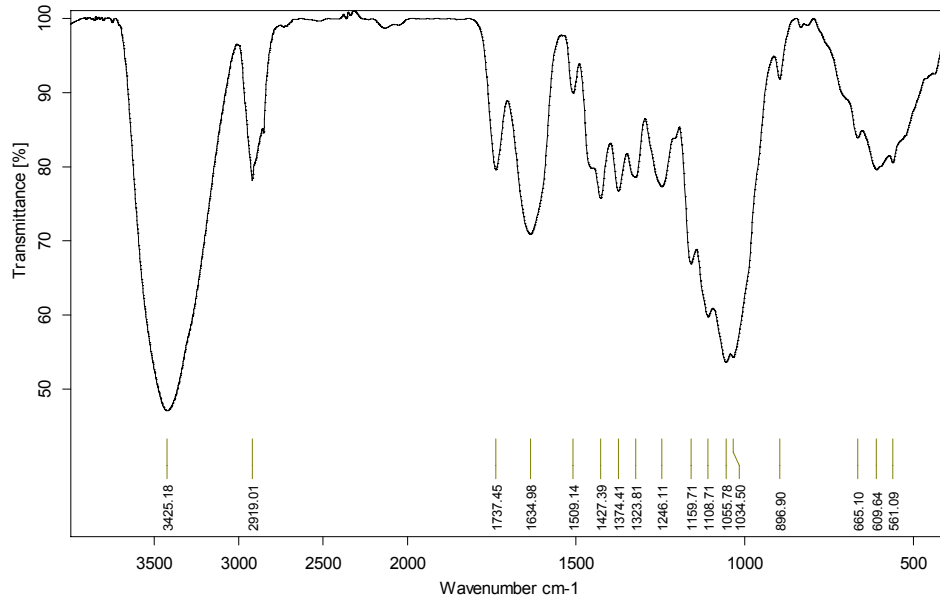


Figura V.11. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru biomasa netratată de câneță

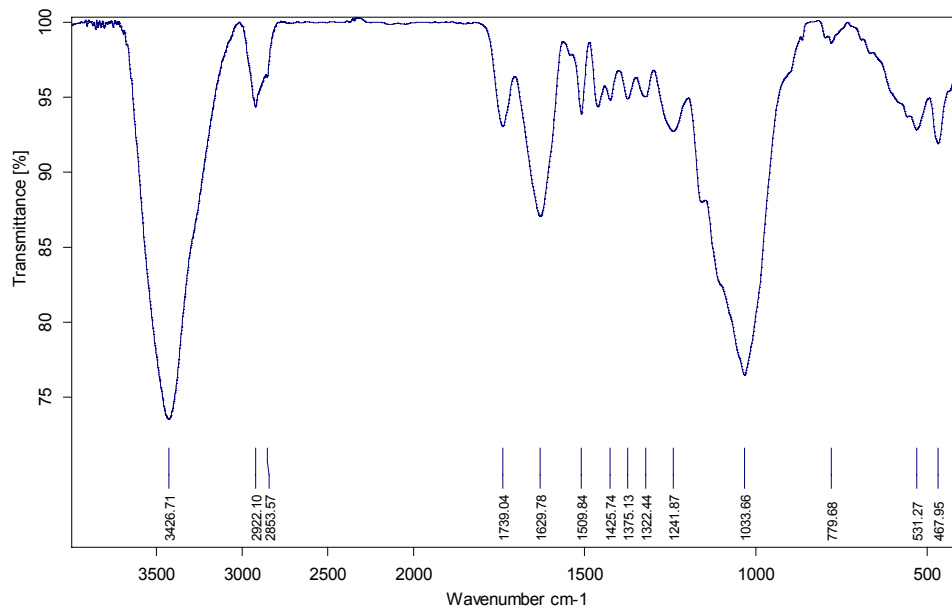


Figura V.12. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru biomasa netratată de stejar

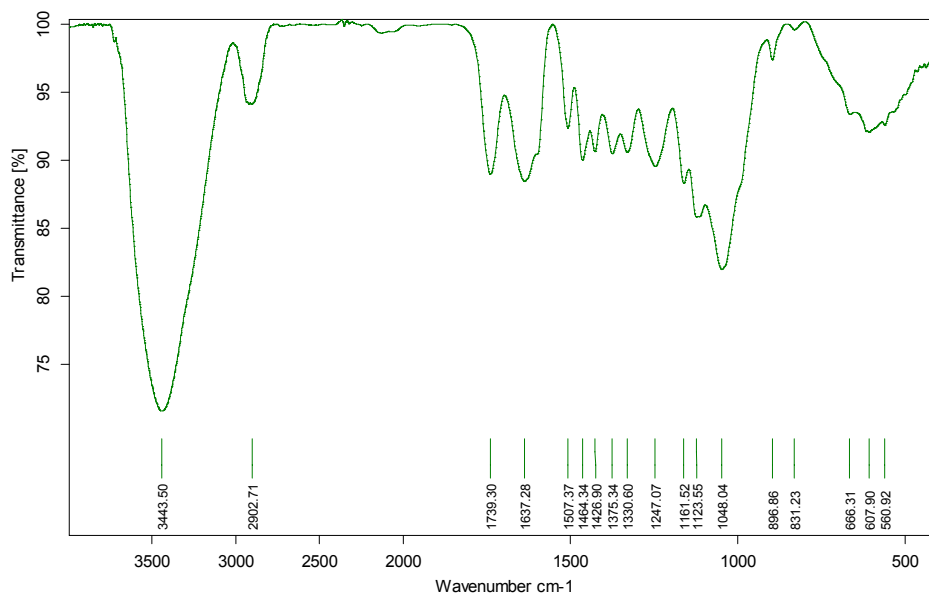


Figura V.13. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru biomasa netratată de salcâm

Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru cele patru tipuri de biomasă lignocelulozică arată un număr mare de picuri, care pot fi atribuite vibrațiilor de valență [149,150], după cum urmează:

- 3410-3430 cm^{-1} vibrații de valență ale grupărilor hidroxil incluse în legături de hidrogen
- 2920 cm^{-1} vibrații de valență ale grupărilor CH_2 și CH
- 1728 cm^{-1} vibrații de valență ale grupărilor $\text{C}=\text{O}$ (carboxil, aldehydică, cetonă)
- 1514 cm^{-1} - structuri aromatice
- 1500 -1200 cm^{-1} vibrații de deformație ale grupărilor CH_2 și CH,OH
- 1200-950 cm^{-1} vibrații de deformație ale legăturilor C-O , C-C , structuri ciclice

Concluzii parțiale:

- umiditatea cea mai ridicată se întâlnește la biomasa de plop, urmată de cea de salcâm, iar biomasa de brad prezintă umiditatea cea mai scăzută;
- Analiza EDAX indică prezența unor heteroatomi, cum ar fi K, Al, Mg, P, Cu și Si;
- Morfologia și compoziția elementară a biomasei lignocelulozice diferă la cele patru probe de biomasă lignocelulozică;
- Concentrația As din probele analizate se află sub limita de detecție a aparatului;

CAPITOLUL VI

Pretratarea biomasei lignocelulozice

VI.1. Hidroliza acidă

a) 12 creuzete de filtrare s-au introdus într-un cuptor la temperatura de 200°C timp de 18 ore, după care acestea s-au introdus într-un exicator pentru răcire timp de o oră, iar mai apoi s-au cântărit cu o precizie de 0,1 mg.

b) Într-o eprubetă s-au introdus 300 mg rumeguș brut (uscat și măcinat în prealabil într-o moară cu bile) și 3 ml H₂SO₄ 72%. Amestecarea completă a probei s-a realizat cu ajutorul unei baghete timp de un minut, după care s-a incubat o oră la 30°C, agitând proba din 10 în 10 minute cu ajutorul unei baghete, fără a înlătura eprubeta din baia de apă. Agitarea este esențială pentru a asigura un contact bun între acid și particule precum și pentru o hidroliză uniformă. Conținutul s-a introdus într-un flacon de 300 ml și s-a adăugat 84 ml apă distilată. Flaconul s-a închis ermetic și s-a introdus timp de o oră într-o incintă termostată la 120°C[23].

VI.2 .Determinarea conținutului de lignină din biomasa pretrată

VI.2.1. Determinarea ligninei insolubile în acid din biomasă

Soluțiile hidrolizate în cuptor la 120°C s-au filtrat la vid utilizând creuzetele de filtrare cântărite anterior. Din filtratul rezultat s-au luat 50 ml și s-a introdus într-un flacon de sticlă pentru determinarea ligninei solubile în acid și a carbohidraților. Solidele s-au spălat apoi cu 25 ml apă distilată. Creuzetele și reziduul insolubil în acid rezultat s-au introdus apoi într-o incintă termostată la 105 °C pentru uscare timp de 4 zile, după care s-au transferat într-un exicator pentru răcire și s-au cântărit cu o precizie de 0,1 mg. S-au introdus din nou în cuptor la 575°C timp de 24 de ore, după care s-au răcit în exicator timp de o oră și s-au cântărit.

Calculul cantității de lignină insolubilă în acid s-a realizat utilizând relația de calcul:

$$\% \text{lignina insolubila in acid} = \left(\frac{M_2 - M_3}{M_1 * \frac{T_{final}}{100} \%} \right) * 100\% \quad (\text{VI.1.})$$

unde:

M₁- greutatea masei inițială;

M₂- greutatea creuzetului cu proba după uscare la 105°C timp de 2 ore;

M₃- greutatea creuzetului cu proba după calcinare la 575°C timp de 3 ore;

T_{final} - % total solide

Biomasa conține în principal celuloză (polimer al glucozei), hemiceluloză (polimer complex al cărui lanț principal este alcătuit mai ales din xilani sau glucomanani) și lignină (polimer fenolic complex). Spre deosebire de ceilalți componenți ai peretelui celular, lignina este în cea mai mare parte a sa insolubilă în acizi minerali[45]. Din acest motiv, lignina poate fi analizată gravimetric, în urma hidrolizei cu acid a fracțiunilor de celuloză și hemiceluloză. În tabelul VI.1. sunt prezentate valorile procentuale de lignină insolubilă în acid pentru biomasa lignocelulozică luată în studiu.

Tabelul VI.1. Cantitatea procentuală de lignină insolubilă în acid, corespunzătoare diferitelor tipuri de biomasă luate în lucru

Tip biomasă lignocelulozică	Lignină insolubilă în acid
Biomasa de brad	47.34 %
Biomasa de salcâm	44.83 %
Biomasa de plop	34.97 %
Biomasa de stejar	40.51 %

Se observă că cea mai mare cantitate de lignină insolubilă în acid se găsește în rumegușul de brad, iar cea mai mică în rumegușul de plop.

VI.2.2. Determinarea ligninei solubile în acid din biomasă

Reziduul rămas după hidroliza unei probe de biomasă este corespunzător cantității de lignină insolubilă în acid. Totuși, această valoare nu reprezintă conținutul total de lignină. O mică parte din lignină este solubilizată în timpul procesului de hidroliză. Aceasta fracțiune de lignină se referă la lignina solubilă în acid și poate fi cuantificată prin spectroscopie UV.

Această procedură descrie o metodă spectrofotometrică de determinare a cantității de lignină solubilizată în timpul procesului de hidroliză a probei de biomasă.

Calculul cantității de lignină solubilă în acid din hidrolizat este dat de relația matematică:

$$\% \text{lignina solubila in acid } ASL (g/l) = \left(\frac{A}{b * a} \right) * df \quad (VI.2.)$$

unde:

- df - factor de diluție;
- A -absorbanta, la 205 nm;
- b - lungimea cuvei, 1 cm;
- a - absorbtivitatea, 110L/g·cm.

Valorile de lignină solubilă obținute în urma pretratării în mediu acid se regăsesc în tabelul VI.2.

Tabelul VI.2. Cantitatea de lignină solubilă în acid din biomasa solidă obținută

Tipul de biomasă	Lignina solubilă în acid din biomasa solida [%]
Brad	0.178
Salcâm	0.391
Plop	0.196
Stejar	0.269

În tabelul VI.3. este redată cantitatea de lignină din biomasa solubilă în acid, în urma hidrolizei acide, pentru sorturile de biomasă.

Tabelul VI.3. Cantitatea de lignină solubilă în acid din hidrolizat (faza lichidă) obținută pentru tipurile de biomasă în urma pretratării în mediu acid

Tip biomasă	Lignină solubilă în acid din hidrolizat [g/l]
Brad	0.00343
Salcâm	0.00718
Plop	0.00466
Stejar	0.004785

Analizând datele prezentate se constată că cea mai mare cantitate de lignină solubilă în acid corespunzătoare filtratului (hidrolizat) s-a obținut în cazul biomasei de salcâm, iar cea mai mică în cazul biomasei de brad.

În tabelul VI.4. este prezentată masa rezidului solid de la hidroliza biomasei înainte și după procesul de uscare.

Tabelul VI.4. Masa rezidului solid de la hidroliza biomasei înainte și după procesul de uscare

Tipul de biomasă	Cantitatea de biomasă supusă hidrolizei, [g]	Cantitatea de reziduu solid umed [g]	Cantitatea de reziduu solid uscat [g]
Proba de brad	3,36	6,597	2,149
Proba de salcâm	3,35	4,244	1,696
Proba de plop	3,37	9,74	2,440
Proba de stejar	3,35	2,382	1,704

Comparând valorile masei diferitelor tipuri de biomasă luate în lucru cu valorile masei rezidului solid obținut în urma hidrolizei acide și uscare se constată că cea mai mare cantitate de biomasă hidrolizată, solubilă în solventul utilizat, este corespunzătoare biomasei de salcâm, fiind urmată îndeaproape de cea obținută din biomasei de stejar.

VI.3. Determinarea conținutului total de hidrați de carbon

VI.3.1. Etalonare pentru analizele HPLC de hidrați de carbon

Pentru a se putea realiza analize cantitative prin metoda HPLC, a fost nevoie de o etalonare cu cantități cunoscute din hidrații de carbon respectivi. Aceste etalonări s-au făcut pentru fructoză, glucoză și xioză, hidrații de carbon cei mai importanți care rezultă în urma pretratamentului și hidrolizei enzimatică a biomasei. Pentru a evita suprapunerea picurilor din proba utilizată cu a picurilor din standard s-au utilizat două tipuri de standard intern manitol și lactoză.

Prepararea soluțiilor standard de zaharuri

Se prepară o soluție de glucoză 20 mg/ml în acetonitril-apa (70:30) și o soluție de xiloză 20 mg/ml în acetonitril-apa (70:30). Din aceste soluții se iau câte 1 ml peste care se adaugă soluție acetonitril-apa (70:30). S-au preparat amestecuri de glucoză, xiloză de concentrații 10, 8, 6, 4, 2, 0,5 mg/ml. S-a utilizat metoda standardului intern, compusul standard fiind lactoza de concentrație 5mg/ml. Condițiile de analiză au fost: cromatograf de lichide de înaltă performanță HPLC, echipat cu detector cu indice de refracție, coloană Zorbax NH₂. S-a lucrat cu eluție de tip izocratic acetonitril-apă (70:30), debit 1 ml/min și volum de injecție 20 μl.

În tabelul VI.5. sunt redate valorile etalonării prin metoda standardului intern cu lactoza.

Tabelul VI.5. Rezultatele etalonării glucozei și xilozei prin metoda standardului intern cu lactoză

Glucoză [mg/ml]	Xiloză [mg/ml]	Standard intern Lactoza [mg/ml]	$\frac{\text{Conc}_{\text{Glucoza}}}{\text{Conc}_{\text{Lactoza}}}$	$\frac{\text{Arie}_{\text{Glucoza}}}{\text{Arie}_{\text{Lactoza}}}$	$\frac{\text{Conc}_{\text{Xiloza}}}{\text{Conc}_{\text{Lactoza}}}$	$\frac{\text{Arie}_{\text{Xiloza}}}{\text{Arie}_{\text{Lactoza}}}$
0,5	0,5	5,0	0,1	0,086	0,1	0,061
2,0	2,0	5,0	0,4	0,320	0,4	0,258
4,0	4,0	5,0	0,8	0,825	0,8	0,636
6,0	6,0	5,0	1,2	1,383	1,2	1,047
8,0	8,0	5,0	1,6	1,534	1,6	1,386
10,0	10,0	5,0	2,0	2,025	2,0	1,848

Analiza și trasarea curbei de etalonare

În figura VI.1. este prezentat un exemplu de cromatogramă de la etalonare, iar în figurile VI.2. și VI.3. curbele de etalonare care arată o dependență liniară.

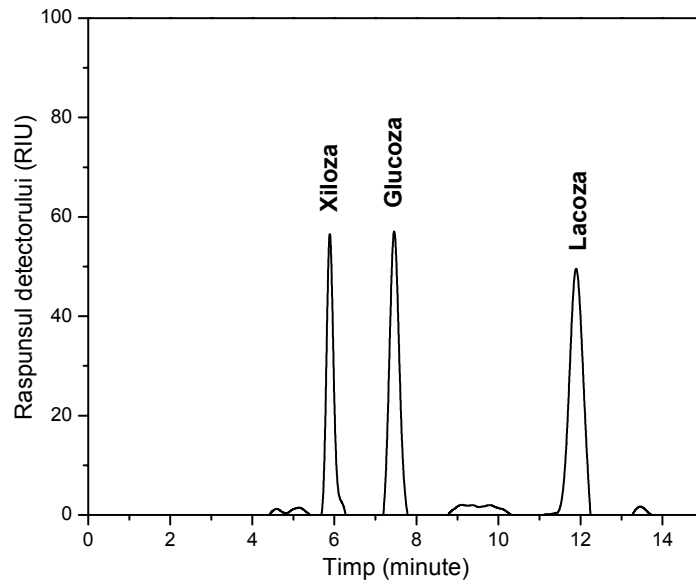


Figura VI.1. Cromatograma HPLC de la etalonarea glucozei și xilozei cu standard intern lactoză (4 mg/ml glucoză, 4 mg/ml xiloză, 5 mg/ml lactoză)

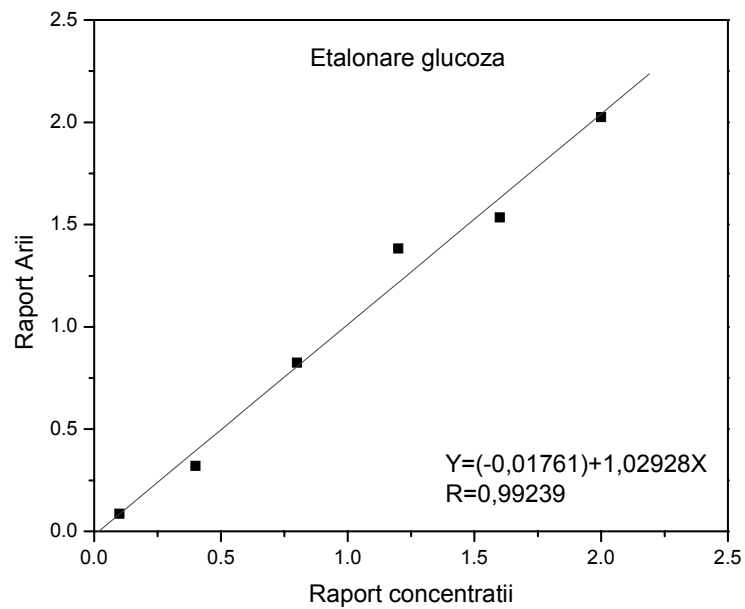


Figura VI.2 . Caracteristica de etalonare a glucozei cu standard intern lactoză

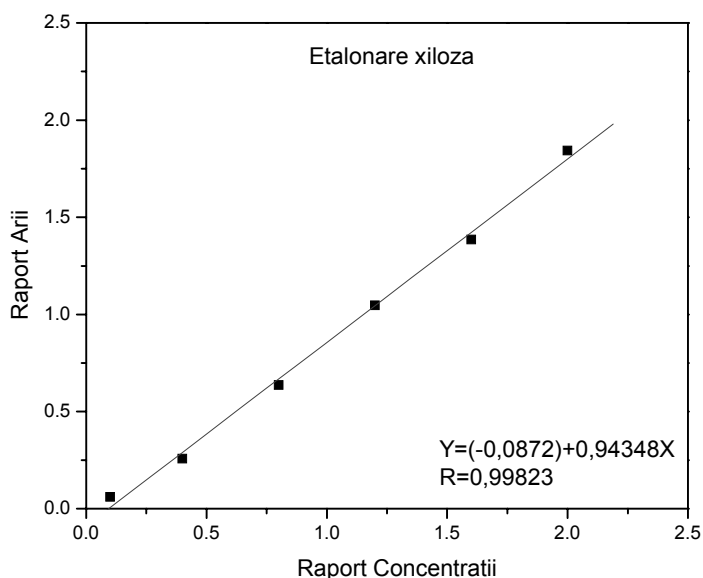


Figura VI.3. Caracteristica de etalonare a xilizei cu standard intern lactoză

Pentru etalonarea xilozei, s-a utilizat metoda standardului intern, compusul standard fiind manitolul. S-au cântărit cantități corespunzătoare de xiloză și manitol, astfel încât să se obțină concentrațiile redată în tabelul VI.6. Concentrația de xiloză a fost variabilă iar cea de standard constantă, astfel încât să se obțină rapoarte de concentrații între 0,1 și 0,4. (Figura VI.4.) [152]

Tabelul VI.6. Rezultatele etalonării xilozei prin metoda standardului intern cu manitol

Nr. probă	Concentrație xiloză [mg/ml]	Arie peak xiloză [mV.min]	Concentrație manitol [mg/ml]	Arie peak manitol [mV.min]	Raport arii	Raport conc
1	0.5	9.3	5	70	0.133	0,1
2	1	10.1	5	57.9	0.174	0,2
3	1.5	15.9	5	70.7	0.225	0,3
4	2	17.3	5	60.3	0.304	0,4

Nr. proba 1 - Probă de brad

Nr. proba 2 - Probă de salcâm

Nr. proba 3 - Probă de plop

Nr. proba 4 - Probă de stejar

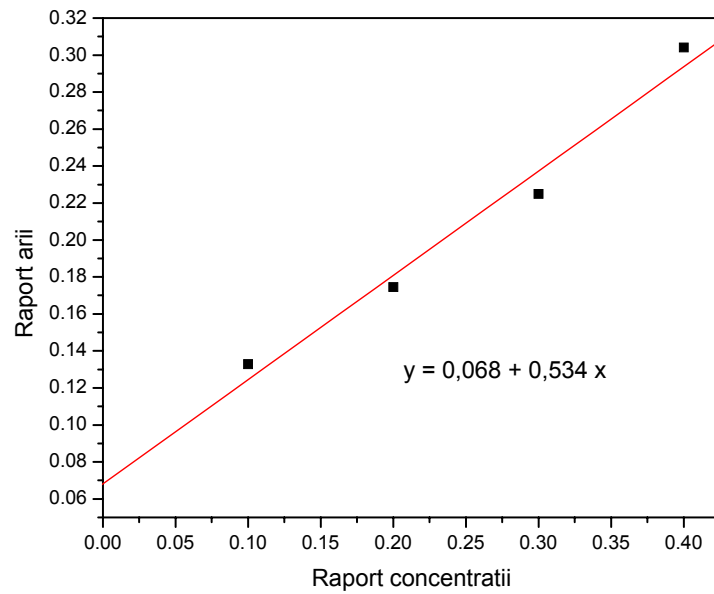


Figura VI.4. Graficul de etalonare pentru xiloză cu standard intern manitol

Figura VI.5. prezintă cromatograma cu standard intern manitol.

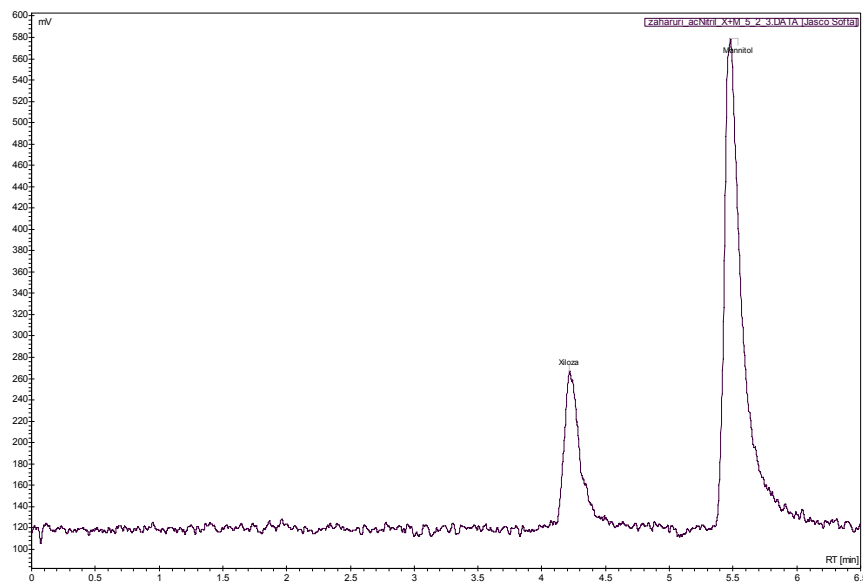


Figura VI.5. Cromatograma HPLC a probei 4 cu standard intern manitol (2 mg/mL xiloză, 5mg/mL manitol)

În tabelul VI.7. sunt redate valorile etalonării prin metoda răspunsului detectorului LSD

Tabelul VI.7. Rezultatele etalonării xilozei prin metoda răspunsului detectorului LSD

Nr. probă	Concentrație [mg/ml]	Arie peak [mV·min]
1	1	7.4
2	2	20.7
3	3	30.5
4	4	41.8

Figura VI.6. prezintă cromatograma de la etalonarea glucozei

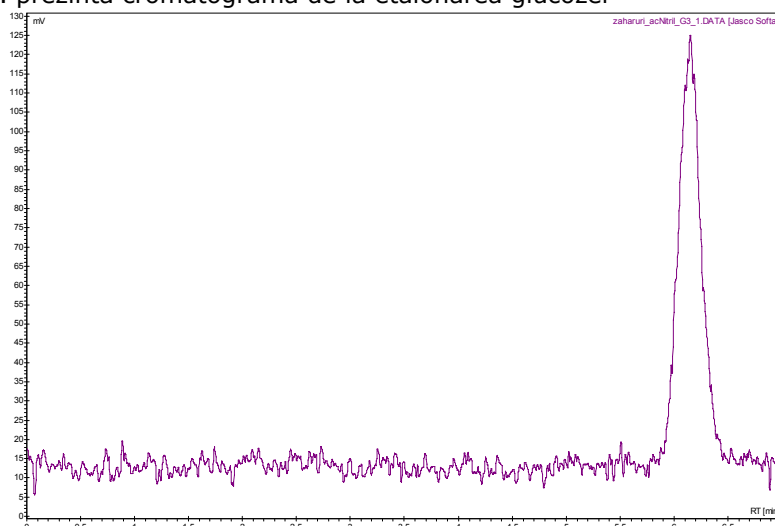


Figura VI.6. Cromatograma HPLC a probei 3 (3 mg/mL) de la etalonarea glucozei

VI.3.2. Analiza hidraților de carbon totali după hidroliza enzimatică a biomasei

Modul de lucru

Pentru a urmări evoluția reacției de hidroliză au fost prelevate probe (500 μ l) la diferite intervale de timp, acestea au fost centrifugate, iar din supernatant s-a luat 400 μ l pentru determinarea cantității de zaharuri totale (exprimate ca glucoză).

În două eprubete s-au pipetat:

Probă:

- 0,4 ml probă
- 0,4 ml H₂O
- 1,2 ml soluție DNS

Martor:

- 0,4 ml tampon acetat de pH = 4,8
- 0,4 ml H₂O

1,2 ml soluție DNS

s-au fiert ambele eprubete 15 minute pe baia de apă, după care s-au răcit timp de 15 minute și s-a citit extincția probei față de martor care a fost eliberată prin hidroliză enzimatică în intervalul de timp considerat până în momentul luării probei, s-a calculat cu relația:

$$C_G = \frac{(E_p + 0.281)}{1.549} V \text{ [mg glucoza]} \quad (\text{VI.3.})$$

unde:

V - volumul total de reacție

VI.3.3. Determinarea hidraților de carbon din bioasa lignocelulozică netratată, pretrată și din celuloza pură microcristalină AVICEL

Hidroliza cu acid sulfuric în sistem eterogen a materialelor lignocelulozice este o metodă care poate avea erori însemnate, deoarece poate avea loc fie o hidroliză incompletă, fie o degradare a monozaharidelor formate. De aceea, s-au realizat și două probe martor, una cu celuloză pură microcristalină Avicel, cealaltă cu glucoză, care au fost supuse aceluiași regim ca și materialele pretratate. S-a urmărit determinarea randamentului de recuperare a glucozei din cele două probe.

Mod de lucru

Într-o eprubetă s-au introdus 300 mg rumeș (brut, pretratată cu aburi sau pretratată cu H₂SO₄ 0,82%) și 3 ml H₂SO₄ 72% și s-a incubat 2 ore la 30°C, agitând eprubeta din 15 în 15 minute, după care conținutul s-a introdus într-un flacon de 300 ml și s-a adăugat 84 ml apă distilată. Flaconul s-a închis ermetic și s-a introdus timp de o oră într-o incintă termostată la 120°C. După o oră s-au luat 20 ml hidrolizat, s-au introdus într-un pahar Berzelius de 50 ml și s-a neutralizat acidul cu CaCO₃ până la pH=5 sau 6, după care proba s-a filtrat.

În două eprubete s-a pipetat:

Probă:

0,2 ml filtrat
0,6 ml soluție DNS 1%

Martor:

0,2 ml tampon acetat de pH=4,8
0,6 ml soluție DNS 1%

s-au fiert 5 minute pe baia de apă după care s-a adăugat în fiecare eprubetă 4 ml apă distilată și s-a citit extincția probei față de martor la λ=540 nm.

Zaharurile totale din probă se calculează cu formula:

$$Z_{TOTAL} = \frac{(E_p + 0.01) 87}{0.27} \text{ [mg]} \quad (\text{VI.4.})$$

87 ml fiind volumul total al soluției de la hidroliză

VI.3. Determinarea conținutului total de hidrați de carbon 85

Deoarece prin tratamentul cu acid sulfuric o parte din zaharuri sunt degradate, s-au efectuat două probe martor, una cu glucoza pură și una cu celuloză pură microcristalină de tip Avicel, pentru a putea calcula un factor de corecție care să fie aplicat probelor de biomasa.

Analiza cantității de glucoză din probele pretratate și netratate la 24 ore s-a determinat și prin cromatografia de lichide de înaltă performanță HPLC utilizându-se detectorul cu indice de refracție, coloană Zorbax NH₂, eluție de tip izocratic cu acetonitril-apă (70:30), debit 1 ml/min, volum de injecție 20 μl.

Pentru determinarea hidraților de carbon din biomasa lignocelulozică s-a utilizat metoda chimică cu acid 3,5-dinitrosalicilic.

Deoarece prin tratamentul cu acid sulfuric o parte din zaharuri sunt degradate, s-au efectuat două probe martor, una cu glucoză pură și una cu celuloză pură microcristalină de tip Avicel, pentru a putea calcula un factor de corecție care să fie aplicat probelor de biomasa.

S-au obținut ca valori medii: pentru Avicel 291,1 mg zaharuri totale, iar pentru glucoză 248,7 mg zaharuri totale. Ținând cont de faptul că teoretic cantitatea de glucoză regăsită trebuia să fie 333 mg în cazul Avicelului și 300 mg în cazul glucozei (figura VI.7.), înseamnă că randamentul de regăsire este:

$$\text{- Avicel} \quad \%_{Avicel} = \frac{291,1}{333} \cdot 100 = 87,4 \quad (\text{VI.5.})$$

$$\text{- glucoză} \quad \%_{glucoza} = \frac{248,7}{300} \cdot 100 = 83,0 \quad (\text{VI.6.})$$

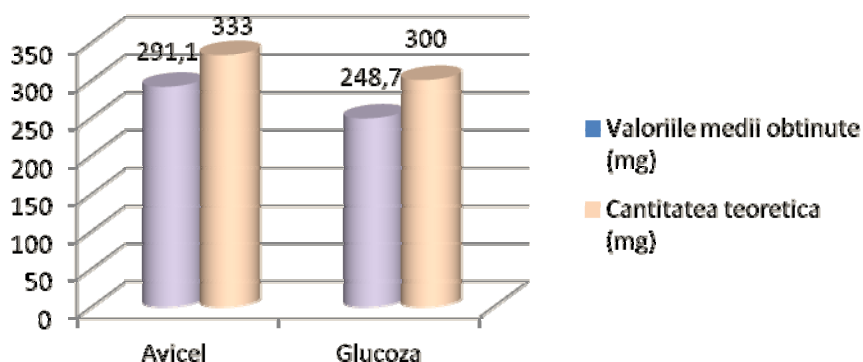


Figura VI.7. Cantitatea de zaharuri totale

S-a luat un randament de regăsire mediu pe baza acestor rezultate de 85,2%, ceea ce înseamnă că factorul de corecție cu care trebuie înmulțite rezultatele de la probele de biomasa este 1,17[153].

În tabelul VI.8. sunt prezentate rezultatele conținutului total de zaharuri și conținutul de lignină din probele de biomasa pretratate.

Tabelul VI.8. Conținutul total de hidrați de carbon și lignină din biomasa lignocelulozică

Proba	V _{filtrat} [ml]	ε [l/g cm]	AIR [mg]	AIR [%]	Cenușă [mg]	Cenușă [%]	ASL [%]	AIL [%]	Lig Total [%]	Zahar totale [mg]
Stejar 1	85	25	144,1	48,0	87,3	29,1	0,51	18,9	19,4	121,0
Stejar 2	85	25	151,8	50,6	88,0	29,3	0,58	21,3	21,8	117,0
Brad 1	84	12	83,5	27,8	5,4	1,8	1,2	26,0	27,2	186,1
Brad 2	84	12	78,3	26,1	2,8	0,9	1,4	16,8	18,2	190,6
Plop 1	84	25	78,6	26,2	14,0	4,7	1,5	17,5	19,0	188,8
Plop 2	84	25	81,1	27,0	4,0	1,3	1,7	25,7	27,4	173,8
Salcâm1	85	12	60,1	20,0	2,9	0,97	3,5	19,1	22,6	203,0
Salcâm2	84	12	73,8	24,6	1,3	0,43	2,9	24,2	27,1	189,8
Cânep1	84	25	41,8	13,9	3,9	1,3	0,7	12,6	13,3	213,5
Cânep2	84	25	53,9	18,0	1,7	0,57	0,8	17,4	18,2	212,1

În tabelul VI.9. sunt prezentate rezultatele conținutului total de zaharuri reducătoare (exprimate ca glucoză) pentru diferite probe de biomasă netratată și Avicel obținute în urma reacției de hidroliză a 100 mg probă netratată cu 50 μl celulază nativă Celluclast 1.5 L în 10 ml tampon acetat pH=4,8, la 40°C.

Tabelul VI.9. Conținutul de zaharuri din probele de biomasă netratată și celuloză pură Avicel

Timp (ore)	Conținut de zaharuri											
	Biomasă netratată										Avicel	
	Stejar		Salcâm		Brad		Plop		Cânepă			
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
2	8,3	21,0	6,3	9,7	11,8	18,8	6,5	10,8	21,6	30,5	30,6	27,6
4	11,1	28,0	9,0	13,8	18,9	30,2	11,2	18,6	28,5	40,2	39,5	35,6
6	15,5	39,0	12,4	18,9	26,3	41,9	14,3	23,7	35,4	50,0	43,0	38,7
8	14,0	35,1	13,3	20,3	37,5	59,8	13,1	21,7	41,9	59,1	58,8	53,0
24	20,9	52,8	18,7	28,6	47,4	75,5	20,8	34,4	57,0	80,3	77,9	70,2

Din tabelul VI.9 se poate observa că eficiența enzimei față de biomasa lignocelulozică este considerabil mai mică decât față de celuloza pură (Avicel), ceea ce se explică pe de o parte prin faptul că Avicelul a avut o granulație mai mică decât biomasa, iar pe de altă parte substratul de biomasă mai conține lignină și alți compuși inhibitori ai acțiunii celulozice. Se pare că lignina nu are o acțiune inhibitoare propriu-zisă, dar ea adsoarbe enzima care nu mai poate hidroliza în condiții corespunzătoare celuloza

VI. 4. Pretratarea fizico-chimică a biomasei lignocelulozice

Au fost investigate mai multe modalități pentru pretratamentul materiilor prime cu conținut de celuloză și s-a determinat conținutul de zaharuri obținute atât în urma pretratamentului cât și a hidrolizei enzimatică care s-a efectuat în etapa următoare pentru materialul solid rezultat după pretratament.

Întrucât rezultatele obținute demonstrează o diminuare a conținutului de zaharide, în urma metodelor convenționale de pretratate utilizate (aburi și hidroliză în mediu acid diluat) comparativ cu proba netratată, s-a încercat pretratarea fizico-chimică a biomasei lignocelulozice utilizând noi metode în vederea creșterii conținutului de zaharide.

Rolul fracționării (pretratării) este de a maximiza randamentul în monozaharidele fermentabile din structura celulozei și hemicelulozei și implicit de creștere a vitezei de hidroliză.

Etapa de pretratate este absolut esențială pentru obținerea bioetanolului prin fermentarea biomasei, întrucât aceasta reprezintă aproximativ 30% din costul total al etanolului[154].

Studiul posibilităților de scindare a celulozei -Au fost investigate mai multe modalități pentru pretratamentul materiilor prime cu conținut de celuloză și s-a determinat conținutul de zaharuri obținute atât în urma pretratamentului cât și a hidrolizei enzimatică, care s-a efectuat în etapa următoare pentru materialul solid rezultat după pretratament. Pentru aceste determinări

s-au folosit 2 sorturi de rumeguș:

I – probă cernută prin site

II - probă măcinată

VI. 4.1. Pretratarea combinată cu acid și microunde a biomasei celulozice

Metodele chimice tradiționale de pretratate implică scindarea fibrelor în condiții variate, de la medii foarte acide la medii alcaline. Hidroliza acidă a fost folosită mult timp, însă are efecte negative asupra mediului înconjurător. Din acest motiv s-a efectuat optimizarea procesului de pretratate a biomasei cu ajutorul microundelor, care permite pretratate substratului lignocelulozic într-o singură etapă, la o temperatură de peste 100°C și într-un interval de timp de până la 30 de minute, cu randamente de până la 50%.

Modul de lucru

Metoda 1

O suspensie formată din 9 g probă uscată (cernută sau măcinată) și 90 ml H₂SO₄ 0,82% s-a introdus în cuptorul cu microunde, folosind următorul program:

- 120°C, 10 minute, putere 37% ;
- 130°C, 5 minute, putere 37% ;
- 150°C, 10 minute, putere 50%.

După răcire suspensia s-a filtrat, filtratul s-a neutralizat cu CaCO₃ până la pH 5,5-6, iar proba s-a spălat de câteva ori cu H₂O distilată și s-a uscat apoi la vid, la 60 °C timp de 5 ore[153].

Rumeguș cernut:

- cânepă (dimensiune ochi sită 1,7 mm)

- stejar (dimensiune ochi sită 0,85 mm)
- brad (dimensiune ochi sită 1,7 mm)

Metoda 2

O suspensie formată din diferite cantități de probă uscată și măcinată (7 g cânepă, 9 g stejar, 4,6 g brad) și H₂SO₄ 0,82% (70 ml, 90 ml, respectiv 46 ml) s-a introdus în cuptorul cu microunde la temperatura de 120°C încălzindu-se treptat până la 160°C timp de 10 minute. După răcire suspensia s-a filtrat, filtratul s-a neutralizat cu CaCO₃ până la pH 5,5-6, iar proba s-a spălat de câteva ori cu H₂O distilată și s-a uscat apoi la vid timp de 5 ore la 60 °C.

Metoda 3

O suspensie formată din 5 g probă uscată și măcinată și 50 ml H₂SO₄ 0,82% s-a introdus în cuptorul cu microunde la 120, 140 și 160°C timp de 5, 15, respectiv 30 minute. După răcire suspensia s-a filtrat, filtratul s-a neutralizat cu CaCO₃ până la pH 5,5-6, iar proba s-a spălat de câteva ori cu H₂O distilată și s-a uscat apoi la vid timp de 5 ore la 60°C.

VI.4.1.1. Determinarea conținutului total de hidrați de carbon din soluțiile obținute după pretratament

Conținutul total de zaharuri reducătoare (exprimate ca glucoză) s-a determinat și în soluțiile rezultate după aceste pretratamente. Probele pretratate au fost filtrate și spălate cu apă pentru a recupera întreaga cantitate de zaharuri care au rezultat prin hidroliză, în timpul acestui proces. Din aceste soluții s-au luat câte 10 ml care au fost neutralizate cu CaCO₃ până la pH 5-6 pentru a preveni degradarea lor[154].

S-a lucrat astfel:

Probă:

- 0,2 ml filtrat
- 0,6 ml soluție DNS 1%

Martor:

- 0,2 ml tampon acetat de pH=4,8
- 0,6 ml soluție DNS 1%

s-au fiert 5 minute pe baia de apă după care s-a adăugat în fiecare eprubetă 4 ml apă distilată și

s-a citit extincția probei față de martor la $\lambda=540$ nm.

Zaharurile totale din probă se calculează cu formula:

$$Z_{TOTAL} = \frac{(E_p + 0.013)}{0.138} [mg / ml] \quad (VI.7.)$$

Folosind metoda pretratării biomasei celulozice cu ajutorul microundelor, cantitatea de zaharuri obținute direct în urma hidrolizei care are loc în timpul pretratamentului, a fost mai mare în cazul probei cernute prin site decât a celui măcinat, deci un grad de mărunțire mai avansat duce la creșterea eficienței pretratamentului. Pornindu-se de la aceeași cantitate de biomasă, cea mai mare cantitate de zaharuri a rezultat în cazul lemnului de esență moale (bradul), deci structura acestuia este atacată mai ușor în condițiile de hidroliză acidă.

Tabelul VI.10. Analiza hidraților de carbon totali (exprimați ca glucoză) din soluțiile (filtrat+ ape de spălare) rezultate după pretratarea probelor cernut/măcinat (Metoda 1)

Zaharuri totale (mg)					
CÂNEPĂ (I)	STEJAR (I)	BRAD (I)	CÂNEPĂ (II)	STEJAR (II)	BRAD (II)
834,44	1154,46	1732,67	714,72	785,73	1142,85

I - Probă cernut ă prin site

II - Probă măcinată

Folosind o metodă de pretratament prin încălzire cu ajutorul microundelor la 160° (tabelul VI.10), s-a obținut o cantitate de zaharuri mai mare în cazul fibrelor de cânepă, structura acestora favorizând atacul acid. Deoarece această metodă de pretratament este cea mai viabilă, s-a efectuat un studiu sistematic prin modificarea temperaturii și duratei de pretratament între niște limite stabilite. Agentul de pretratament a fost în toate cazurile H₂SO₄ 0,82%, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul VI.12.

Tabelul VI.11. Analiza hidraților de carbon totali din soluțiile (filtrat+ ape de spălare) rezultate după pretratarea probelor măcinate (Metoda 2)

Zaharuri totale (mg)		
CÂNEPĂ (II)	STEJAR (II)	BRAD (II)
116,96	110,56	89,59

Tabelul VI.12. Analiza hidraților de carbon totali (exprimați ca glucoză) din soluțiile (filtrat+ ape de spălare) rezultate după pretratarea probelor măcinate (120°C, 140°C și 160°C la timpul de 5,15 și 30 minute) (Metoda 3)

Timp	Zaharuri totale (mg)								
	CÂNEPĂ			STEJAR			BRAD		
	120°C	140°C	160°C	120°C	140°C	160°C	120°C	140°C	160°C
5min	177,0	261,7	-	117,8	213,8	-	58,0	336,9	-
15min	183,9	378,7	1328,2	135,5	278,9	936,5	101,4	541,3	1845,3
30min	238,7	482,2	1260,4	150,1	522,3	973,3	245,1	420,3	1960,6

Din tabelul VI.12. se poate observa că prin creșterea temperaturii de pretratament a crescut cantitatea de zaharuri obținută, ceea ce era de așteptat. De asemenea, o durată mai mare de pretratament a determinat în general obținerea în soluțiile rezultate a unei cantități mai ridicate de zaharuri, însă în funcție de temperatură. La temperaturi mai scăzute (120°C și 140°C), timpul de pretratament a avut o influență mai mare, în timp ce la 160°C creșterea acestui timp nu a mai influențat cantitatea de zaharuri rezultată. Aceste rezultate trebuie apreciate în corelare cu cele de la hidroliza enzimatică, pentru că în final contează obținerea unui randament cât mai mare de zaharuri fermentescibile pe ansamblul procesului.

VI.4.2. Pretraterea combinată cu acid/bază și liofilizare a biomasei celulozice

Pretraterea prin liofilizare se referă la un procedeu de fracționare a lignocelulozei în bipolimerii constituenți pentru a facilita atacul enzimatic, în mediu slab acid sau bazic, la temperatură și presiune scăzută [154].

Modul de lucru

O suspensie de 1 g probă uscată și măcinată (câneapă, stejar, brad) s-a tratat cu 10 ml soluție NaOH 1% sau HCl 1% și apoi s-a liofilizat la temperatura de -52 °C, timp de 25 ore. Probele liofilizate au fost spălate cu 25 ml apă ultrapură, s-au filtrat, iar filtratul a fost neutralizat cu soluție H₂SO₄ 0,82% [153] (în cazul soluțiilor bazice) sau CaCO₃ (în cazul celor acide).

VI.4.2.1. Determinarea conținutului total de hidrați de carbon din soluțiile obținute după pretratament

Determinarea conținutului total de hidrați de carbon din soluțiile obținute după pretraterea biomasei celulozice prin liofilizare (cu acid sau bază) s-a efectuat ca și în cazul pretratării combinate cu acid și microunde a biomasei celulozice.

S-a studiat efectul pretratării combinate atât în mediu slab acid (HCl 0.1N) cât și în mediu slab bazic (NaOH 1%) și liofilizare a biomasei celulozice. S-a observat că în ambele cazuri cantitatea de zaharuri obținută după pretratament a fost evident mult mai mică, pentru că în condițiile de temperatură respective viteza de hidroliză este evident foarte mică (tabelul VI.13.). S-a constatat că prin această metodă se realizează însă o degradare mult mai avansată a structurii lignocelulozice, ceea ce favorizează hidroliza enzimatică.

Tabelul VI.13. Analiza hidraților de carbon totali (exprimați ca glucoză) din soluțiile (filtrat+ ape de spălare) rezultate după pretratamentul probelor liofilizate

Biomasa	Mediu de reacție	Zaharuri totale (mg)	Aria picului [mV.min]
CÂNEPĂ	HCl	5.979	1.1357
	NaOH	5.974	157.24
STEJAR	HCl	5.973	3.590
	NaOH	5.951	153.926
BRAD	HCl	5.982	25.483
	NaOH	5.976	34.131
SALCÂM	HCl	5.988	8.790
	NaOH	5.578	51.499

Comparativ cu metodele chimice tradiționale de pretratere, fracționarea lignocelulozei combinate acid/bază și liofilizare are următoarele avantaje:

- utilizarea exclusivă a unor reactivi ieftini;
- desfășurarea procesului într-o singură etapă;
- randament ridicat de obținere a monozaharidelor (pentoze și hexoze) din lignoceluloză;

VI.4.3. Ultrasonarea biomasei celulozice

S-a studiat pretratarea biomasei lignocelulozice de tip lemn esență tare (stejar) prin ultrasonare în apă, unde s-a urmărit efectul etapei de fracționare.

Un amestec de 0.5 g probă uscată și 20 ml apă ultrapură s-a supus ultrasonării timp de 60 minute la temperatura de 50°C iar apoi extractul a fost centrifugat, apoi filtrat cu un filtru de 0.45μm și uscat.

Pentru a urmări influența etapei de pretratare asupra probelor în ceea ce privește structura de suprafață și compoziția elementare a biomasei cât și pentru a evidenția procesul de hidroliză probele ultrasonate au fost supuse analizei calitativă prin microscopie electronică de baleiaj/EDAX și analizei calitativă prin spectroscopia FT-IR.

VI.5. Caracterizarea fizico - chimica a biomasei pretratate prin ultrasonare

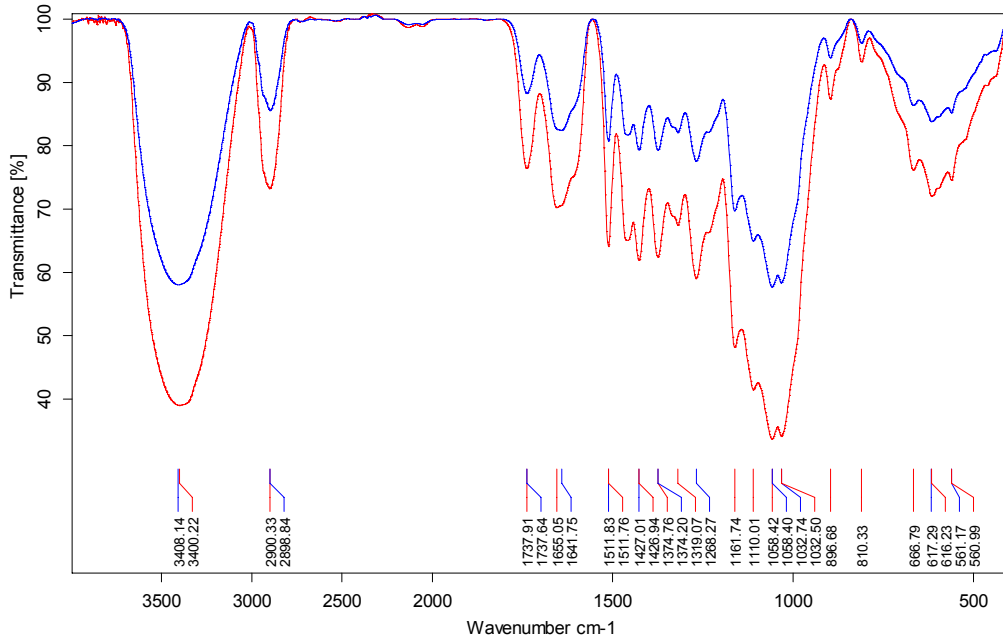
Caracterizarea fizico - chimică a biomasei netratate cât și cea care a fost supusă pretratării a fost realizată pentru a evidenția efectul etapei de fracționare. Biomasă lignocelulozică a fost supusă analizei calitativă prin spectroscopia FT-IR și analiza cantitativă prin microscopie electronică de baleiaj/EDAX.

VI.5.1. Analiza calitativă prin spectroscopia FT-IR

Analiza calitativă prin spectroscopie de FT-IR a fost realizată pentru a evidenția procesul de pretratament asupra biomasei lignocelulozice.

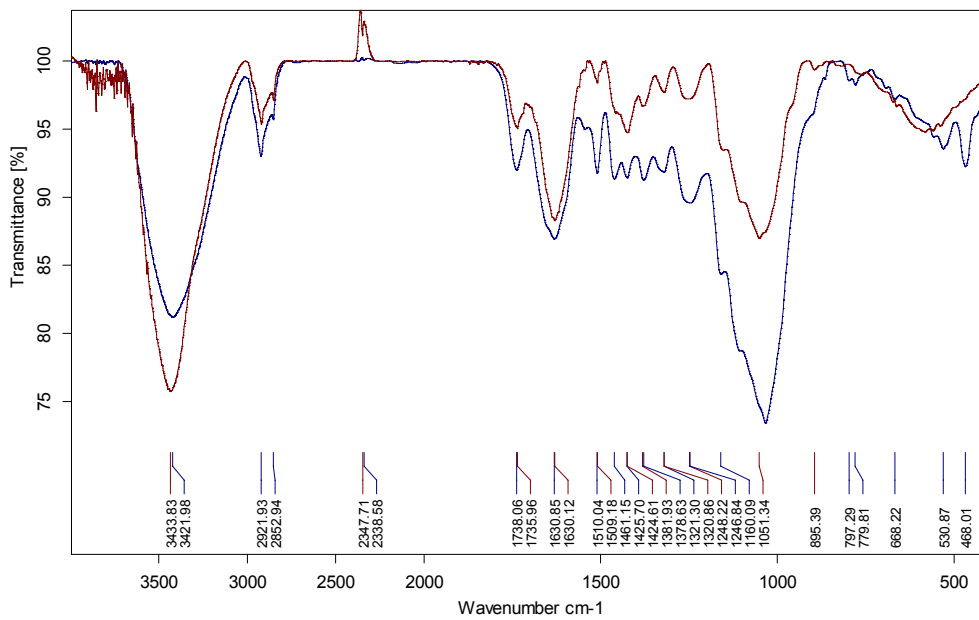
Atât biomasă netratată cât și cea supusă pretratării prin ultrasonare, au fost studiate prin spectroscopie de FT-IR pentru a se observa numărul de picuri, care pot fi atribuiți vibrațiilor de valență și de deformație ale grupărilor funcționale prezente[149].

Analiza prin spectroscopie de FT-IR ce a fost efectuată asupra probelor de biomasă lignocelulozică studiate (lemn esență tare, moale și de tip ierbos), după etapa preliminară de pregătire mecanică cât și după pretratarea biomasei prin ultrasonare, sunt prezentate în următoarele figuri VI.8. -VI.13.



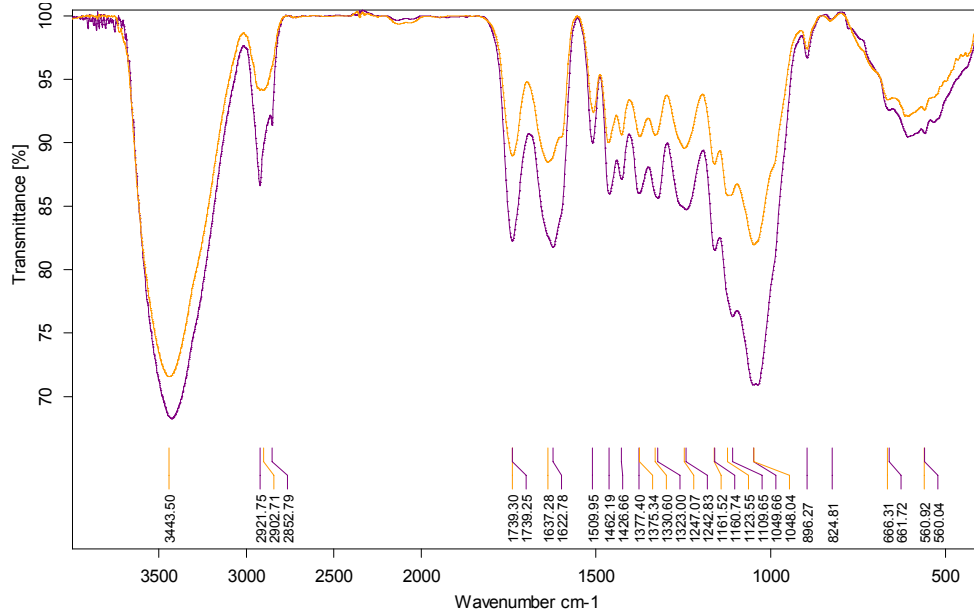
* bioamasa netratata * bioamasa tratata

Figura VI.8. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru biomasa netratată și pretrată de brad



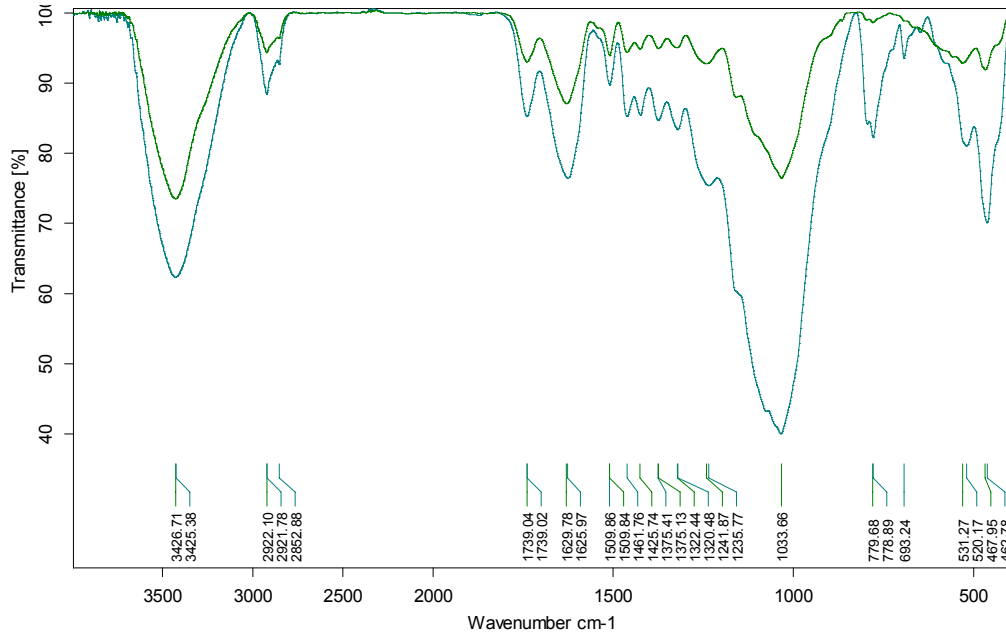
* bioamasa netratata * bioamasa tratata

Figura VI.9. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru biomasa netratată și pretrată de cânepă



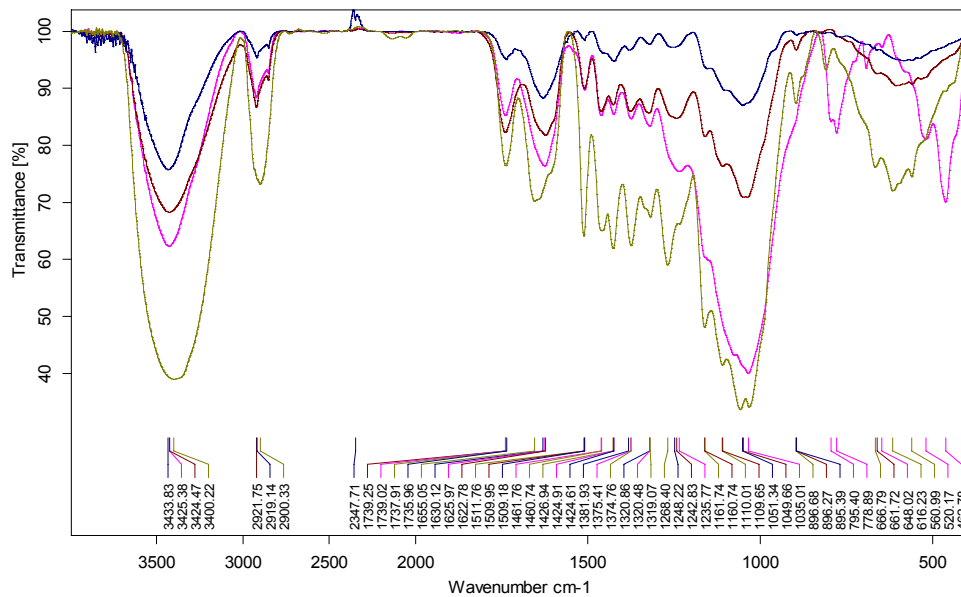
* bioamasa netratata * bioamasa tratata

Figura VI.10. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru biomasa netratată și pretrată de salcâm



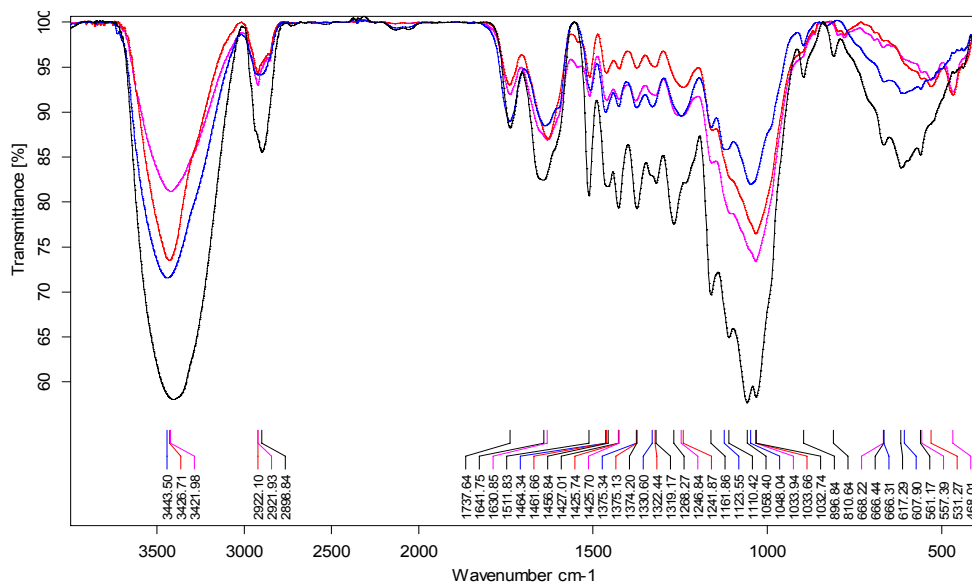
* bioamasa netratata * bioamasa tratata

Figura VI.11. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru biomasa netratată și pretrată de stejar



Biomasa: brad, salcam, stejar, canepa

Figura VI.12. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru cele patru tipuri biomasă netratată



Biomasa: brad, salcam, stejar, canepa

Figura VI.13. Studiile prin spectroscopie de FT-IR efectuate pentru cele patru tipuri biomasă pretrată prin ultrasunare

În spectrul IR al probelor de biomasă lignocelulozică (figurile VII.8-VII.11) se pot observa un număr mare de picuri, care pot fi atribuiți vibrațiilor de valență și de deformație caracteristice principalelor componente ale lignocelulozei: monozaharide și lignină. Astfel se regăsesc: benzi de absorbție caracteristice

aldehidelor, nucleu aromatic, legături hidroxil de tip fenolic, legături carboxil, legături carbon-carbon [150, 151].

În toate cele patru probe biomasa tratată prezintă o scădere de intensitate a benzilor de la $3450-3400\text{ cm}^{-1}$ ce corespunde vibrațiilor de valență ale grupărilor hidroxil incluse în legături de hidrogen. În intervalul $2922-2900\text{ cm}^{-1}$ pot fi observate vibrațiile de valență ale grupărilor CH_2 și CH . Reducerea în benzile 1732 și 1248 cm^{-1} indică vibrații de valență ale grupărilor C=O (carboxil, aldehydică, cetonică) și legăturii hemiceluloză-lignină datorată complexului lignină-carbohidrat.

Spectrele FT-IR au arătat că degradarea și solubilizarea carbohidraților și a ligninei a avut loc în probele de biomasă lignocelulozică pretratate.

VI.5.2. Analiza calitativă prin microscopie electronică de baleiaj/EDAX

Eficiența etapei de pretratere a fost evidențiată și cu ajutorul analizei calitative prin microscopie de baleiaj/EDAX, cu un microscop electronic de baleiaj Inspect S.

Probele de biomasă lignocelulozică pretrată nu au necesitat o prelucrare în prealabil și au fost analizate în condiții de lucru ca și în cazul biomasei netratate descrise în subcapitolul V.4.

Figurile VI.14. – V.16. prezintă morfologia și compoziția elementară a biomasei lignocelulozice, ce a fost evidențiată în urma analizei calitative prin microscopie electronică de baleiaj/EDAX.

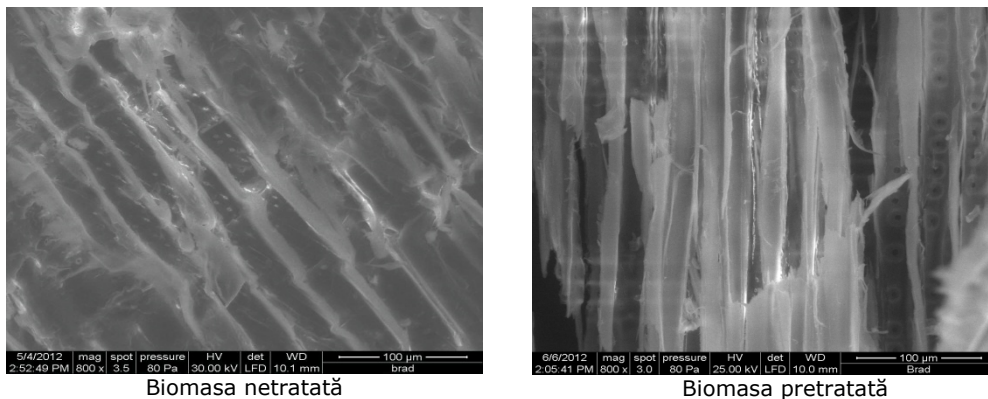


Figura VI.14. Imagini SEM efectuate pentru biomasa netratată și pretrată de brad

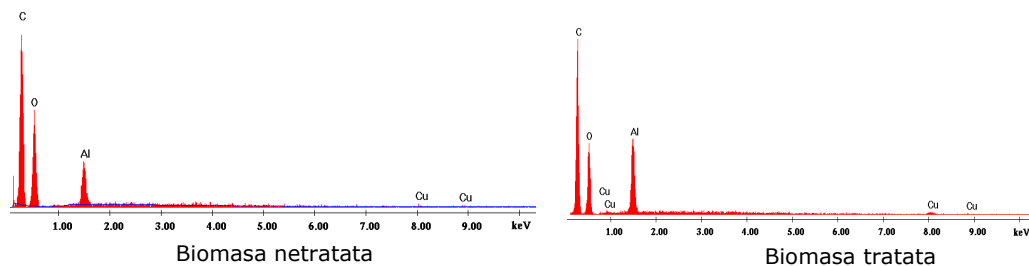


Figura VI.15. Spectrele EDAX pentru biomasa netratată și pretrată de brad

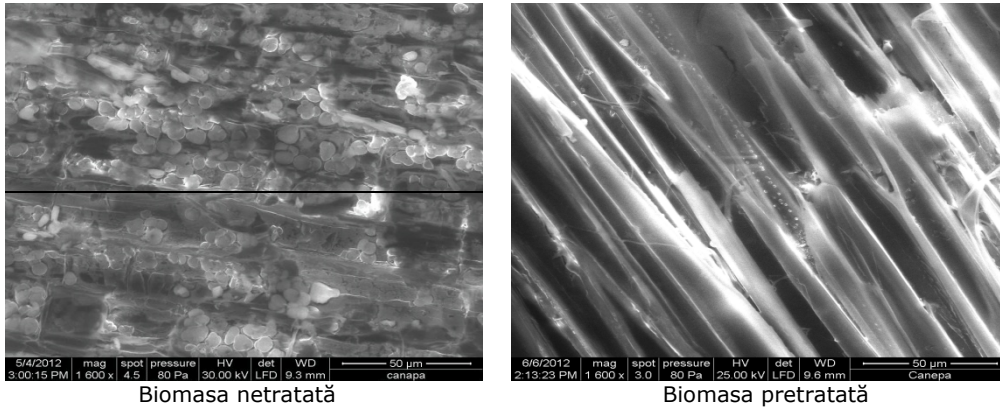


Figura VI.16. Imagini SEM efectuate pentru biomasa netratată și pretrată de cânepă

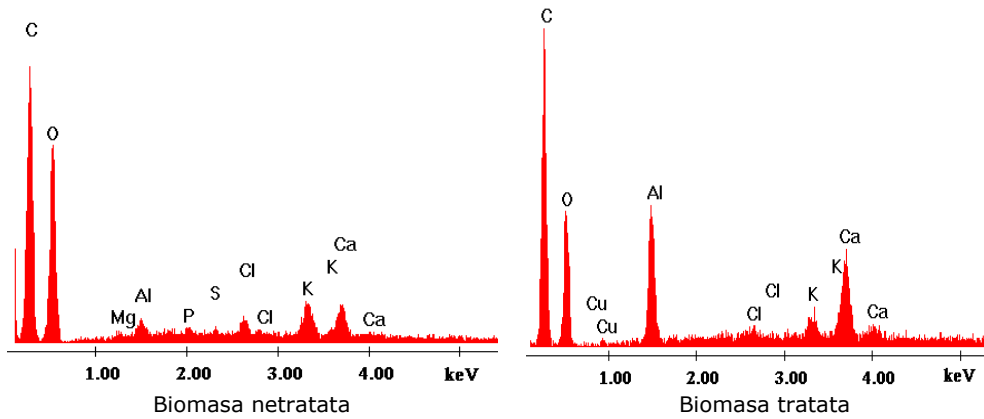


Figura VI.17. Spectrele EDAX pentru biomasa netratată și pretrată de cânepă

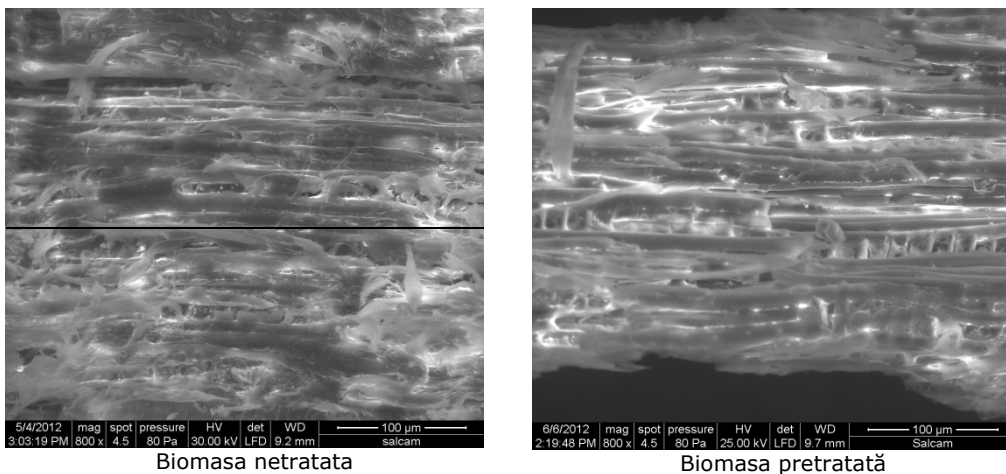


Figura VI.18. Imagini SEM efectuate pentru biomasa netratată și pretrată de salcâm

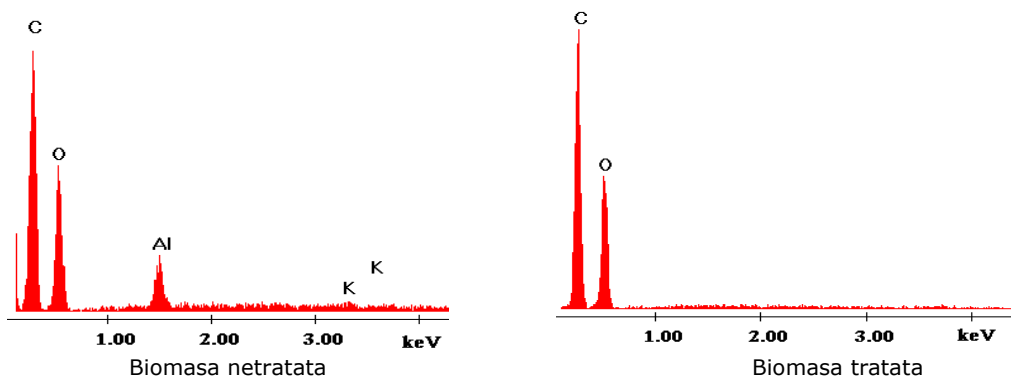


Figura VI.19. Spectrele EDAX pentru biomasa netratată și pretrată de salcâm

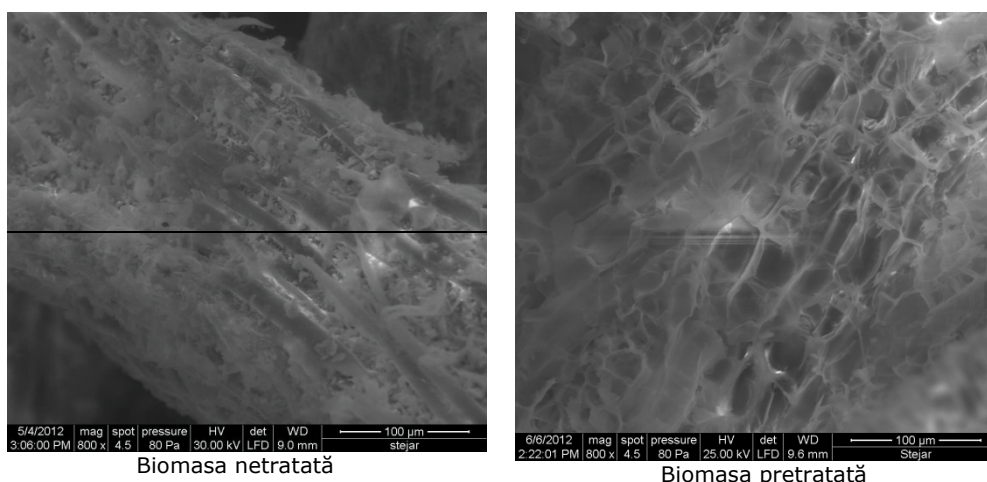


Figura VI.20. Imagini SEM efectuate pentru biomasa netratată și pretrată de stejar

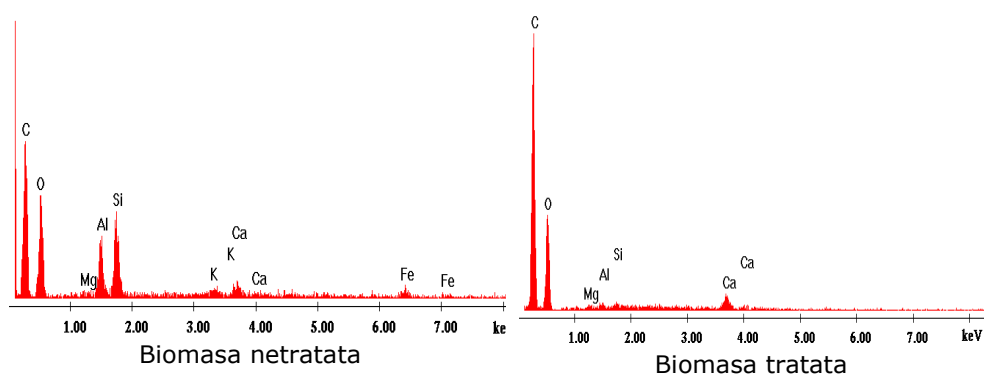


Figura VI.21. Spectrele EDAX pentru analiză elementală a biomasei netratată și pretrată de stejar

Imaginile SEM au arătat că pentru biomasa lignocelulozică prezintă o structură de suprafață relativ intactă, în timp ce pentru probele tratate prin ultrasonare structura lignocelulozică este perturbată prin ruperea ligninei. Structura de bază a celulozei se păstrează, iar unii complexi lignină carbohidrați sunt condensați pe suprafața biomasei lignocelulozice. O structură poroasă crește suprafața accesibilă celulozei ceea ce duce la o creștere a acțiunii celulozei asupra biomasei lignocelulozice pretratată[150].

Efectul pretratării diferă la cele patru probe de biomasă lignocelulozică, astfel constatându-se că distrugerea și fragmentarea cea mai vizibilă este în cazul bradului.

Din analiza elementară pe suprafață se constată că concentrațiile procentuale de masă ale carbonului și oxigenului, în cazul probelor supuse pretratării sunt mai ridicate decât în cazul probelor netratate. Acest fapt se datorează fragmentării legăturilor dintre principalii constituenți majoritari: celuloza, lignina și hemiceluloza[151].

Doar în cazul probelor de lignoceluloză de tip ierbos (cânepă) prin prelucrarea probelor are loc o modificare a conținutului de minerale: o scădere de Mg, P, Cu și S, și o creștere de Al după etapa de pretratare, prin scindarea fizico-chimică (ultrasonare).

Concluzii parțiale:

- Cantitatea procentuală cea mai mare de lignină insolubilă în acid, se regăsește în proba de brad iar procentul cel mai scăzut în proba de plop;
- Cea mai mare cantitate de lignină solubilă în acid este cea corespunzătoare filtratului (hidrolizat) obținut în cazul probei de salcâm, iar cea mai mică în cazul probei de brad;
- Cea mai mare cantitate de solide totale și deci cea mai mică cantitate de umiditate corespunzătoare tipurilor de biomasă supuse analizei, s-a obținut în cazul probei de brad ;
- Pentru etalonarea xilozei, s-a utilizat metoda standardului intern, compusul standard fiind manitolul;
- Pentru etalonarea glucozei s-a procedat în mod asemănător, cu excepția faptului că nu s-a utilizat standard intern iar calculul de etalonare s-a realizat pe baza ariilor picurilor de glucoză, la diferite concentrații;
- Complexele enzimice care au fost achiziționate pentru hidroliza materialelor celulozice au eficiență ridicată, preparatul Accelerase 1000 de la Genencor ducând la un grad de hidroliză mai mare, atât în cazul substratului etalon (Avicel) cât și al celor naturale (rumeguș pretratat);
- Pretratarea combinată cu acid și microundelor a biomasei, permite pretraterea substratului lignocelulozic într-o singură etapă, la o temperatură de peste 100°C și într-un interval de timp de până la 30 minute, cu randamente de până la 50%;
- Se evită degradarea monozaharidelor și formarea produșilor intermediari furani și fenoli compuși ce inhibă procesul de fermentare, diminuând în acest fel randamentul etanolului. Formarea acestor inhibitori este favorizată de hidroliza care are loc la temperaturi ridicate și acizi concentrați care inhibă fermentarea;
- Pretraterea combinată în mediu slab acid sau bazic și liofilizare a biomasei lignocelulozice ajută atacul enzimatic, , la temperatură și presiune scăzută;

- Comparativ cu metodele chimice tradiționale de pretratare, procedeul de fracționare a lignocelulozei are următoarele avantaje: utilizarea exclusivă a unor reactivi ieftini; desfășurarea procesului într-o singură etapă; randament ridicat de obținere a monozaharidelor (pentoze și hexoze) din lignoceluloză; cost redus; nu necesită recuperarea acidului.
- Analiza EDAX indică prezența unor heteroatomi, cum ar fi K, Al, Mg ,P,Cu și Si;
- Prin spectroscopia de FTIR s-a pus în evidență modificările constituenților lignocelulozei (celuloza, hemiceluloză și lignoceluloză);
- Din imaginile SEM se poate observa că efectul pretratării este cel mai vizibil în cazul biomasei lignocelulozice de brad;
- Morfologia și compoziția elementară a biomasei lignocelulozice diferă la cele patru probe de biomasă lignocelulozică;

CAPITOLUL VII

Hidroliza enzimatică

VII.1. Reactivi și aparatură

Pentru determinarea proteinelor s-au utilizat: reactiv Folin-Ciocalteu (Merck), NaOH (Chimopar), Na₂CO₃ (Chimopar), tartrat dublu de sodiu și potasiu (Fluka), CuSO₄ (Chimopar), albumină serică de bovină BSA (Fluka).

Pentru analiza conținutului de hidrați de carbon s-au utilizat: NaOH (Chimopar), acid acetic glacial (Chimopar), glucoză (Merck), acid 3,5-dinitrosalicilic DNS (Merck), fenol (Chimopar), sulfit de sodiu (Chimopar).

Pentru determinarea activității celulei s-au utilizat următorii reactivi: acid acetic glacial (Chimopar), apă distilată, NaOH (Chimopar), carboximetilceluloză CMC (Fluka), acid 3,5-dinitrosalicilic DNS (Merck), tartrat de sodiu și potasiu (Merck), glucoză (Merck).

Microorganismele utilizate pentru inocularea mediilor de cultură au fost: *Trichoderma reesei*, *Zymomonas mobilis* și *Butyrivibria fibrisolvans*.

Inocularea culturilor s-a realizat în condiții sterile, într-o hotă cu reflux laminar - Laminar Flow Advanced Bio Safety Cabinet, BIOQUELL Medical Limited, Anglia.

Termostatarea mediilor de cultură timp de mai multe zile la 30°C s-a realizat într-un incubator - ILW 115 STD, Pol-Eko-Aparatura, Polonia.

VII.2. Metode de analiză

VII.2.1. Metoda Lowry de determinare a proteinelor

Principiul metodei

Dozarea proteinelor (domeniu 25-500 μg) se bazează pe formarea unui complex cupric în urma reacției proteinei cu un reactiv alcalin de cupru (reacția biuretului) și pe reducerea fosfomolibdaților și fosfowolframaților din reactivul Folin-Ciocalteu de către compuşii fenolici din proteină (în special tirozina).

VII.2.1.1. Etalonarea soluției de BSA prin metoda Lowry

Reactivi și soluții

- *Reactiv Folin-Ciocalteu.* Înainte de întrebuințare se diluează o parte reactiv și două părți apă distilată;
- *Soluție alcalină A.* Se dizolvă 4 g NaOH, 10 g Na₂CO₃ și 0,2 g tartrat dublu de sodiu și potasiu în apă distilată și se aduce la 1000 ml în balon cotat;
- *Soluție B.* Soluție CuSO₄ 0,5%;
- *Reactiv alcalin de cupru.* Se prepară înainte de folosire, amestecând 50 ml soluție alcalină A cu 1 ml soluție B;

- Soluție etalon de albumină serică de bovină (BSA) în apă distilată (1 mg/ml).

Mod de lucru

S-au luat cote parte din soluția etalon de BSA și s-au introdus în 10 eprubete completând cu apă distilată la 0,2 ml. S-a adăugat în ordine 5 ml reactiv alcalin de cupru și 0,5 ml reactiv Folin-Ciocalteu. Probele astfel obținute s-au lăsat la temperatura camerei 30 minute, apoi s-a citit extincția la lungimea de undă de 660 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea soluției de BSA cu apă distilată. Pentru siguranța determinării s-au făcut două probe în paralel. Rezultatele s-au trecut în tabelul VII.1.

Tabelul VII.1. Etalonarea soluției de BSA prin metoda Lowry

Nr. crt.	Soluția de BSA (ml)	Apă distilată (ml)	Extincție	Cantitate proteină (mg)
1(martor)	-	0,20	-	0,00
2.	0,02	0,18	0,049	0,02
3.	0,04	0,16	0,095	0,04
4.	0,06	0,14	0,144	0,06
5.	0,08	0,12	0,202	0,08
6.	0,10	0,10	0,253	0,10
7.	0,12	0,08	0,283	0,12
8.	0,14	0,06	0,334	0,14
9.	0,16	0,04	0,356	0,16
10.	0,18	0,02	0,434	0,18
11.	0,20	-	0,416	0,20

S-a făcut reprezentarea grafică a extincției în funcție de cantitatea de proteină (figura VII.1.). Această reprezentare este de forma unei drepte cu ecuația:

$$E = b \cdot C_p \quad (\text{VII.1.})$$

unde:

E = extincție

b = panta dreptei

C_p = cantitate de proteină, (mg)

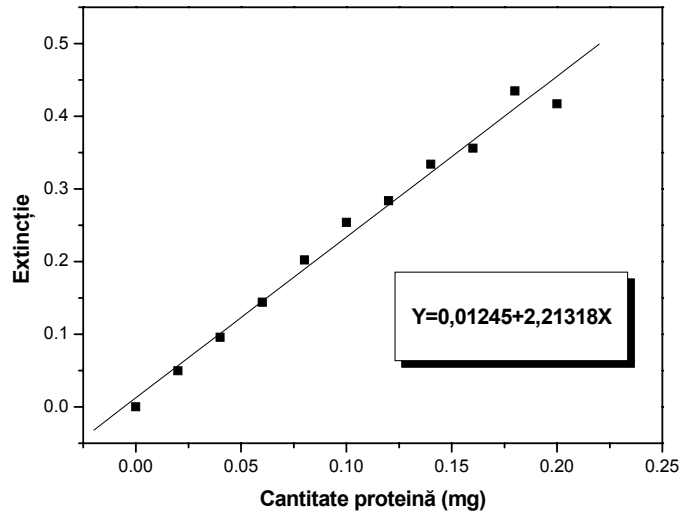


Figura VII.1. Caracteristica de etalonare a soluției de BSA prin metoda Lowry

VII.2.1.2. Determinarea conținutului în proteine dintr-o probă necunoscută

Mod de lucru

Într-o eprubetă s-au introdus 0,2 ml probă, 0,2 ml apă distilată, 5 ml reactiv alcalin de cupru și 0,5 ml reactiv Folin-Ciocalteu. S-a lăsat la temperatura camerei 30 minute, apoi s-a citit extincția la 660 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea probei cu apă distilată. Pentru siguranța determinării s-au făcut două probe în paralel.

Conținutul de proteine din probă s-a determinat cu relația:

$$C = \frac{1}{2,21318} E \cdot 5 \cdot F \text{ (mg/ml)} \quad (\text{VII.2.})$$

unde:

5 = diluția probei la 1 ml

F = factorul de diluție al soluției enzimatic

VII.2.2. Determinarea activității celulazei

Pentru caracterizarea enzimelor obținute, s-a determinat activitatea celulazică pe substrat de carboximetilceluloză, utilizând metoda cu acid acid 3,5-dinitro-salicilic (DNS).

VII.2.2.1. Etalonare standarde de glucoză

Reactivi necesari

a. Soluție tampon acetat de sodiu 0,05 M, pH 4,8

La 900 ml apă distilată se adaugă 2,85 ml acid acetic glacial. În timpul agitării magnetice se adaugă NaOH 50 % până la pH 4,8. Se aduce la un volum total de 1 litru cu apă distilată.

b. Soluție de acid 3,5-dinitrosalicilic (DNS)

Într-un balon cotat de 100 ml se introduce 1,0 g DNS, 200 mg fenol, 50 mg sulfid de sodiu și se aduce la semn cu NaOH 1%. Soluția de acid 3,5-dinitrosalicilic se păstrează maxim o săptămână la 4 °C, putându-se reîmprospăta după 3 zile prin adăugare de sulfid de sodiu.

e. Soluții standard de glucoză

Prepararea soluțiilor standard de glucoză

Se prepară o soluție de glucoză 5,0 mg/ml tampon acetat 0,05 M, pH 4,8. Din această soluție se iau câte 1 ml peste care se adaugă soluție tampon acetat 0,05 M, pH 4,8. Modul de lucru schematic este prezentat în tabelul VII.2.

Tabelul VII.2. Prepararea soluțiilor standard de glucoză

Soluție Glucoză (ml)	Soluție tampon acetat 0,05 M, pH 4,8 (ml)	Diluție	Concentrație (mg/ml)
1,0	2,3	1 :3,3	1,5
1,0	3,0	1 :4	1,25
1,0	4,0	1:5	1,0
1,0	5,7	1:6,7	0,75
1,0	9,0	1:10	0,5
1,0	19,0	1:20	0,25

Modul de lucru

Modul de lucru schematic este prezentat în tabelul VII.3. Se pipetează 0,4 ml soluție standard de glucoză în eprubetele cu probă, iar în blanc 0,4 ml soluție tampon acetat 0,05 M, pH 4,8, după care se adaugă în fiecare eprubetă câte 0,4 ml apă distilată și 1,2 ml soluție de DNS.

Toate eprubetele se pun la fiert 15 minute pe baia de apă pentru formarea culorii, apoi se răcesc sub un jet de apă.

Tabelul VII.3. Modul de lucru schematic

Reactivi	Glucoză	Blanc
Soluție standard de glucoză (ml)	0,4	
Soluție tampon acetat de sodiu 0,05 M, pH 4,8 (ml)		0,4
Apă distilată (ml)	0,4	0,4
Soluție DNS (ml)	1,2	1,2
Fierbere 15 minute		

Standardele de glucoză se spectrofotometrează la 575 nm, citirea făcându-se față de blanc. Toate probele se fac în duplicat. Dacă diferența dintre valorile citite ale extincțiilor este mai mică decât 3% se face media rezultatelor obținute, dacă este mai mare se repetă analiza.

Se face reprezentarea grafică a extincției standardelor de glucoză în funcție de cantitatea de glucoză. Această reprezentare (Figura VII.2.) este de forma unei drepte având ecuația:

$$E = a + b \cdot C_G \quad (\text{VII.3.})$$

unde:

E= extincția
 C_G = cantitatea de glucoză, mg/ml
 a=ordonata la origine
 b= panta dreptei

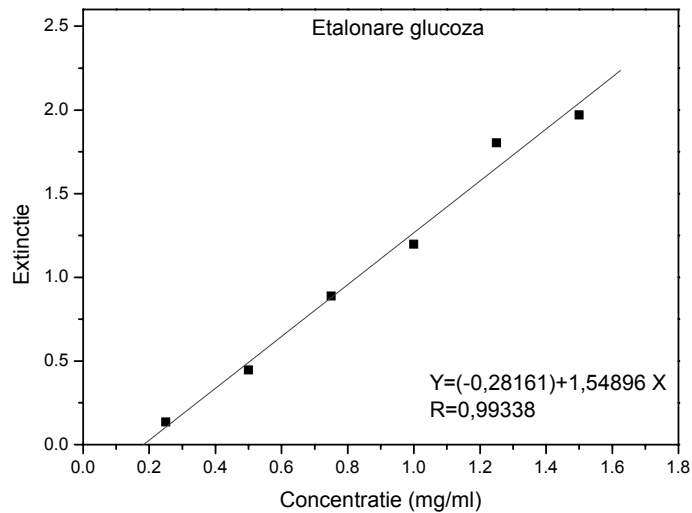


Figura VII.2. Etalonare standarde de glucoză

VII.2.2.2. Determinarea propusă a activității celulazei

Mod de lucru

Modul de lucru schematic este prezentat în tabelul VII.4. Se pipetează în eprubeta cu probă 1,0 ml proba și se incubează 2 minute la 50°C, după care se pipetează 0,5 ml soluție substrat, atât în eprubeta cu probă cât și în celelalte eprubete. Se incubează proba 30 minute la 50°C, după care se adaugă 1,0 ml proba în eprubeta cu martorul.

Tabelul II.4. Mod de lucru schematic al determinării activității celulazei

Reactivi	Proba	Martor
Proba (ml)	1,0	-
Incubare 2 minute la 50°C		
Soluție substrat CMC 2%	0,5	0,5
Incubare 30 minute la 50°C		
Soluție celulază (ml)	-	1,0

Determinarea cantității de glucoză s-a calculat în modul următor:Mod de lucru

În două eprubete (probă și martor) s-au pipetat după cum urmează:

Probă:

0,4 ml probă
0,4 ml H₂O
1,2 ml soluție DNS

Martor:

0,4 ml tampon acetat de pH = 4,8
0,4 ml H₂O
1,2 ml soluție DNS

Ambele eprubete au fost introduse în baia de apă la fierbere pentru 15 minute, după care s-au răcit și s-a citit extincția probei față de martor la $\lambda = 575$ nm.

Toate probele se fac în duplicat. Dacă diferența dintre valorile citite ale extincțiilor este mai mică decât 3 %, se face media rezultatelor obținute, dacă este mai mare, se repetă analiza.

Cantitatea de glucoză din probă se calculează pe baza dreptei de etalonare realizate cu ajutorul unor standarde de glucoză, cu relația următoare:

$$C_G = \frac{(E_P - E_M)}{1,54896} \text{ dilutia proba } V \text{ [mg glucoza]} \quad (\text{VII.4.})$$

unde:

V-volumul total (1,5 ml)

Calculul activității enzimatice

O unitate reprezintă cantitatea de enzimă aflată într-un ml soluție de enzimă care pune în libertate 1 μ mol zaharuri reducătoare (exprimate ca glucoză) într-un minut, la 30°C.

Formula de calcul a activității este:

$$A_{\text{CMC}} = \frac{\text{mg glucoză} \cdot 1000}{180 \cdot 1,0 \cdot 30} \text{ [U/ml]} \quad (\text{VII.5.})$$

VII.3. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei din culturi de microorganisme în condiții anaerobe

Un interes deosebit prezintă microorganismele în raport cu industria petrochimică. Microorganismele fotosintetizante utilizează energia solară pentru producerea biomasei, care poate fi convertită, ca și deșeurile vegetale, în biocombustibili (metan și etanol), de alte microorganisme.

Metabolizarea compușilor organici macromoleculari la nivelul celulei microbiene constă în descompunerea celulozei și hemicelulozei, degradarea substanțelor pectice, descompunerea lipidelor, degradarea acizilor nucleici, degradarea chitinei și transformarea protidelor [155].

Capacitatea enzimelor de a crește de până la 10¹⁴ ori viteza unei reacții, condițiile blânde de acțiune, specificitatea și posibilitatea de reglare a activității, constituie un avantaj major al acestora [156].

VII.3.1. Substraturi și condiții de cultură pentru obținerea de celulaze extracelulare

VII.3.1.1. Culturi de *Trichoderma reesei*

Compoziția mediului de cultură: mediu natural (extract de cartofi) la 200 ml
200 ml extract de cartofi
5 g celuloză/l mediu de cultură

Mod de lucru

1. Alcătuirea mediului de cultură
2. Sterilizare – autoclavare la 120°C, 20 min, presiune 1 atm
3. Răcire la 30°C
4. Inoculare în condiții sterile în hotă cu reflux laminar
5. Barbotare N₂ în mediul din vas
6. Termostatare (în condiții anaerobe) timp de mai multe zile la 30°C
7. Prelevare probe pentru – determinarea activității enzimatică (400 μl probă)
+ proteine (200 μl probă)

VII.3.1.2. Culturi de *Zymomonas mobilis*

Compoziția mediului de cultură: mediu natural (extract de cartofi) la 200 ml
200 ml extract de cartofi
5 g celuloză/l mediu de cultură

Mod de lucru

1. Alcătuirea mediului de cultură
2. Sterilizare – autoclavare la 120°C, 20 min, presiune 1 atm
3. Răcire la 30°C
4. Inoculare în condiții sterile în hotă cu reflux laminar
5. Barbotare N₂ în mediul din vas

VII.3. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei din culturi 107

6. Termostatare (în condiții anaerobe) timp de mai multe zile la 30°C
7. Prelevare probe pentru – determinarea activității enzimaticе (400 μl probă)
+ proteine (200 μl probă)

VII.3.1.3. Culturi de *Butyrivibria fibrisolvens*

Compoziția mediului de cultură: mediu natural (extract de cartofi) la 200 ml

200 ml extract de cartofi
2 g celuloză/l mediu de cultură

Mod de lucru

1. Alcătuirea mediului de cultură
2. Sterilizare – autoclavare la 120°C, 20 min, presiune 1 atm
3. Răcire la 30°C
4. Inoculare în condiții sterile în hotă cu reflux laminar
5. Barbotare N₂ în mediul din vas
6. Termostatare (în condiții anaerobe) timp de mai multe zile la 30°C
7. Prelevare probe pentru – determinarea activității enzimaticе (400 μl probă)
proteine (200 μl probă)

VII.3.2. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei

VII.3.2. 1. Celulaze din *Trichoderma reesei*

Culturile au fost incubate mai multe zile la temperatura de 30°C, fără agitare, în condiții anaerobe. La diferite intervale de timp au fost luate probe care au fost analizate pentru activitatea celulazică pe substrat standard de carboximetilceluloză și pentru conținutul în proteine.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul VII.5, iar pe baza valorilor activităților și a glucozei rămase neconsumate din acest tabel, s-a construit graficul din figura VII.3.

Tabelul VII.5. Activitatea celulazică și conținutul total de proteine în culturile de *Trichoderma reesei*.

Timp [ore]	Sursa de carbon	Glucoză(mg)	Activitate [U/ml]	Proteine[mg/ml]
24	Celuloza	6,06	1,122	0,964
48	5 g/l	5,90	3,520	0,998
144		4,19	7,760	1,039

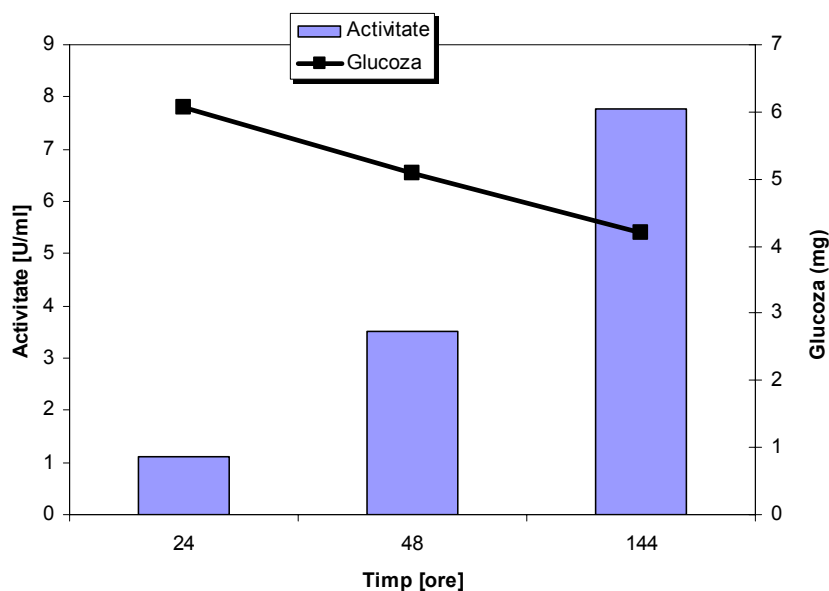


Figura. VII.3. Evoluția în timp a activității celulazei produse de *Trichoderma reesei* și a cantității de glucoză

Dezvoltarea microorganismului a fost foarte rapidă în condițiile de cultură date. Se observă că s-a înregistrat o cantitate mare de proteine deja după 24 de ore de cultură, cantitate care s-a menținut aproximativ constantă până în a 6-a zi. Activitatea celulazică a prezentat o creștere continuă pe toată perioada urmărită, obținându-se o valoare de 7,76 U/ml după 144 de ore. Aceste rezultate sunt comparabile cu cele raportate în literatură, care dau valorile cele mai mari de activitate celulazică pentru culturile de *Trichoderma reesei* după 7 zile. Acest lucru se poate explica prin mediul de cultură diferit care a fost utilizat și prin faptul că în condițiile noastre pH-ul nu a fost menținut la o anumită valoare[157].

Cantitatea de glucoză a scăzut până la valoarea de 4,19 mg, ceea ce arată că încă există sursă de hrană necesară dezvoltării în continuare a microorganismului pentru producere de celulază.

VII.3.2.2. Celulaze din *Zymomonas mobilis*

Conținutul total de proteine obținute prin urmărirea în timp a culturilor de *Zymomonas mobilis* realizate în același mod cu cele din *Trichoderma reesei*, sunt prezentate în tabelul VII.6.

Tabelul VII.6. Conținutul total de proteine în culturile de *Zymomonas mobilis*

Timp [ore]	Sursa de carbon	Proteine [mg/ml]
24	Celuloza 5 g/l	0,971
48		0,771
144		0,918

VII.3. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei din culturi 109

Acest microorganism nu a produs celulază, dar s-a demonstrat faptul că se dezvoltă în condițiile aerobe studiate, ceea ce este important pentru utilizarea sa la producerea altor enzime[157].

VII.3.2.3. Celulaze produse de microorganismele din rumen

Nu există date de literatură care să certifice utilizarea microorganismelor din rumen pentru obținerea industrială de celulaze sau direct pentru hidroliza materiilor prime lignocelulozice. Acest lucru se datorește probabil condițiilor mai dificile pentru a cultiva aceste microorganisme *in vitro*.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul VII.7. iar pe baza valorilor activităților și a glucozei rămase neconsumate din acest tabel s-a construit graficul din figura II.4.

Tabelul VII.7. Activitatea celulazică și conținutul total de proteine în culturile de *Butyrivibria fibrisolvens*

Timp[ore]	Sursa de carbon	Glucoză (mg)	Activitate[U/ml]	Proteine[mg/ml]
24	Celuloza 2 g/l	16,840	3,118	0,942
48		10,714	5,132	0,944
144		4,188	7,756	0,956

Experimentele noastre au arătat valori constante ale conținutului de proteine din mediu pe durata cultivării, cu detectarea activității celulazice (tabelul VII.7.)

Activitatea celulazică a prezentat o creștere continuă pe tot parcursul celor 6 zile, atingând o valoare maximă de 7,756 U/ml în a șasea zi. Glucoza nu a fost consumată în întregime, ceea ce demonstrează că mai existau resurse de creștere a biomasei, însă acest lucru nu prezintă importanță în condițiile în care am fost interesată doar de producerea de celulază. *Butyrivibria fibrisolvens* s-a dovedit a fi un microorganism care a prezentat activitate enzimatică asemănătoare cu cea înregistrată în culturile de *Trichoderma*[158].

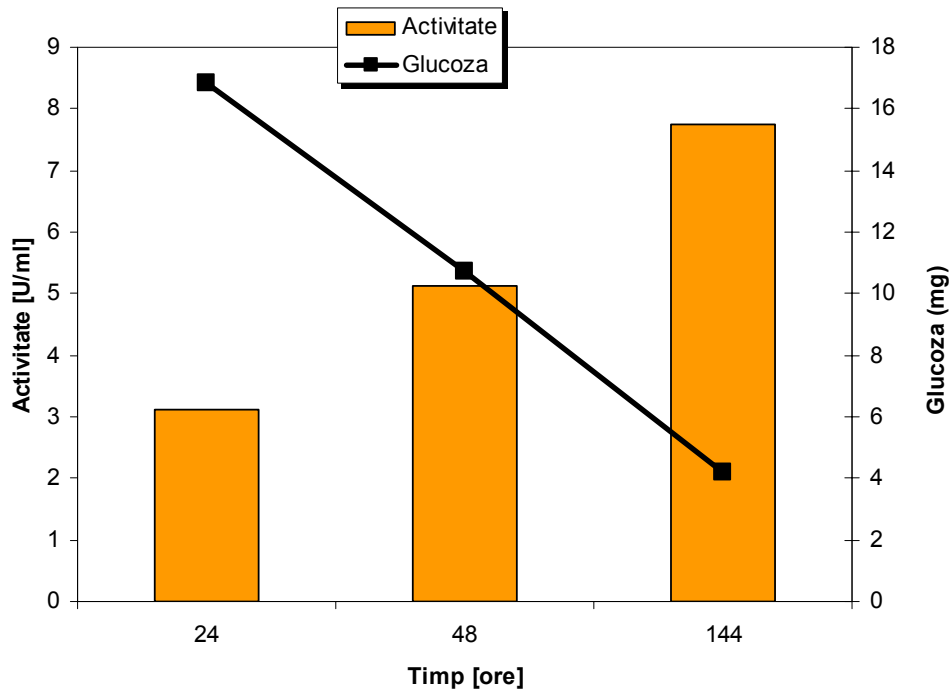


Figura. VII.4. Evoluția în timp a activității celulozei produse de *Butyrivibria fibrisolvens* și a cantității de glucoză

VII.4. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei din culturi de microorganisme în condiții aerobe

Medii de cultură, pentru a fi corespunzătoare, trebuie să îndeplinească câteva condiții: să conțină substanțe plastice și energetice necesare cultivării microbului însămânțat, adică să asigure surse de azot, de hidrați de carbon, de săruri minerale, de apă, de vitamine și factori de creștere necesari dezvoltării și reproducerii celulelor bacteriene, să satisfacă cerințele de aerobioză sau anaerobioză ale agentului ținând cont de faptul că, în timp ce bacteriile aerobe pot folosi oxigenul molecular, cele anaerobe nu se pot dezvolta în prezența oxigenului liber, să aibă o concentrație de ioni de hidrogen (pH) optimă și să fie sterile, pentru a permite izolarea în cultură pură a germenului respectiv.

Pe măsura cunoașterii tot mai aprofundate a exigentelor unei bacterii s-a ajuns la realizarea unor medii de cultură cu o compoziție adecvată și precisă. În unele cazuri chiar s-a ajuns la situația optimă de preparare a unor medii sintetice standardizate, nemaifiind necesare ingrediente de origine animală sau vegetală a căror compoziție poate varia foarte mult [157].

VII.4.1. Substraturi și condiții de cultură pentru obținerea de celulaze extracelulare

VII.4.1.1. Culturi de *Trichoderma reesei*

Compoziția mediului de cultură: mediu natural (extract de cartofi) la 200 ml

200 ml extract de cartofi
5 g celuloză/l mediu de cultură

Mod de lucru

1. Alcătuirea mediului de cultură
2. Sterilizare – autoclavare la 120°C, 20 min, presiune 1 atm
3. Răcire la 30°C
4. Inoculare în condiții sterile în hotă cu reflux laminar
5. Termostatare (în condiții aerobe) timp de mai multe zile la 30°C
6. Prelevare probe pentru – determinarea activității enzimaticice (400 μl probă)
+ proteine (200 μl probă)

VII.4.1.2. Culturi de *Zymomonas mobilis*

Compoziția mediului de cultură: mediu natural (extract de cartofi) la 200 ml

200 ml extract de cartofi
5 g celuloză/l mediu de cultură

Mod de lucru

1. Alcătuirea mediului de cultură
2. Sterilizare – autoclavare la 120°C, 20 min, presiune 1 atm
3. Răcire la 30°C
4. Inoculare în condiții sterile în hotă cu reflux laminar
5. Termostatare (în condiții aerobe) timp de mai multe zile la 30°C
6. Prelevare probe pentru – determinarea activității enzimaticice (400 μl probă)
+ proteine (200 μl probă)

VII.4.1.3. Culturi de *Butyrivibria fibrisolvens*

Compoziția mediului de cultură: mediu natural (extract de cartofi) la 200 ml

200 ml extract de cartofi
2 g celuloză/l mediu de cultură

Mod de lucru

1. Alcătuirea mediului de cultură
2. Sterilizare – autoclavare la 120°C, 20 min, presiune 1 atm
3. Răcire la 30°C

4. Inoculare în condiții sterile în hotă cu reflux laminar
5. Termostatare (în condiții aerobe) timp de mai multe zile la 30°C
6. Prelevare probe pentru – determinarea activității enzimatică (400 μl probă) proteine (200 μl probă)

VII.4.2. Obținerea celulazelor din culturi de microorganisme

VII.4.2.1. Celulaze din *Trichoderma reesei*

Culturile au fost incubate mai multe zile la temperatura de 30°C, fără agitare, în condiții aerobe. La diferite intervale de timp au fost luate probe care au fost analizate pentru activitatea celulazică pe substrat standard de carboximetilceluloză și pentru conținutul în proteine.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul VII.8. , iar pe baza valorilor activităților și a cantității de glucoză din acest tabel s-a construit graficul din figura VII.5 .

Tabelul VII.8. Activitatea celulazică și conținutul total de proteine în culturile de *Trichoderma reesei*.

Timp[ore]	Sursă de carbon	Glucoză(mg)	Activitate[U/ml]	Proteine[mg/ml]
24	Celuloza 5 g/l	10,197	-	0,525
48		7,138	18,88	0,544
144		5,214	0,96	0,437

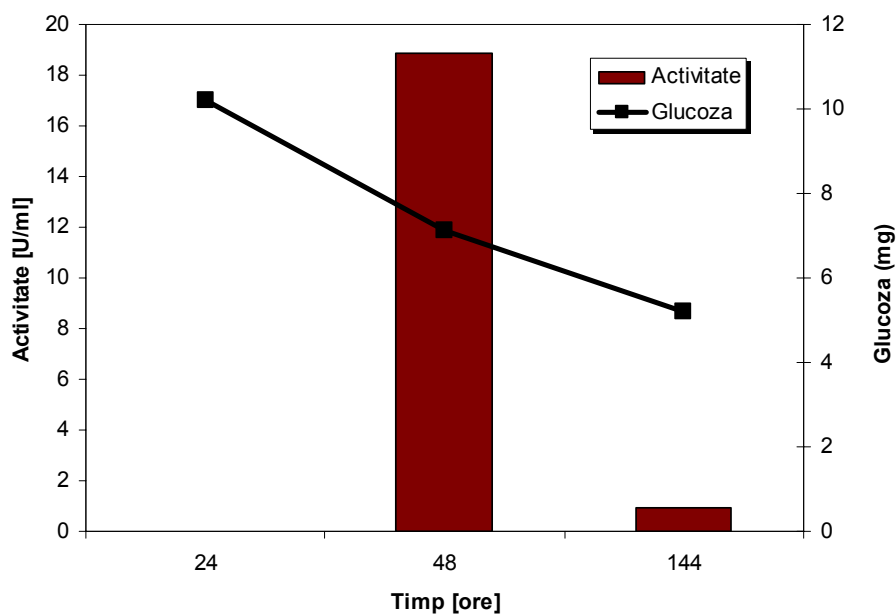


Figura. VII.5. Evoluția în timp a activității celulazice produse de *Trichoderma reesei* și a cantității de glucoză

VII.4. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei din culturi 113

Dezvoltarea microorganismului a avut loc în mod diferit în condiții aerobe decât în condiții anaerobe. Cantitatea de proteină formată a fost mai mică, ceea ce indică o dezvoltare mai slabă. Această cantitate de proteină s-a menținut aproximativ constantă pe toată durata cultivării, cu o ușoară scădere în perioada ultimelor zile.

Celulaza nu a fost detectată după prima zi, însă s-a format în cantitate destul de mare după 48 de ore, după care a dispărut aproape total din mediu, la timpul de 6 zile.

Aceste rezultate demonstrează că celulaza poate fi biosintetizată și în condiții aerobe din culturi de *Trichoderma reesei*, însă după un anumit timp optim probabil se sintetizează și alte enzime, de exemplu proteaze, care degradează celulaza. De aceea, este foarte important să se oprească cultura în momentul în care activitatea celulazică devine maximă[157].

Faptul că acest microorganism poate sintetiza celulază, atât în condiții anaerobe cât și aerobe, prezintă importanță în perspectiva realizării unor culturi mixte cu alte microorganisme, ceea ce necesită o flexibilitate pronunțată în ce privește conținutul de oxigen al mediului.

VII.4.2.2. Celulaze din *Zymomonas mobilis*

Conținutul total de proteine obținute prin urmărirea în timp a culturilor de *Zymomonas mobilis* realizate în aceleși mod cu cele din *Trichoderma reesei*, sunt prezentate în tabelul VII.9.

Tabelul VII.9. Conținutul total de proteine în culturile de *Zymomonas mobilis*

Timp [ore]	Sursă de carbon	Proteine[mg/ml]
24	Celuloza 5 g/l	0,482
48		0,438
144		0,524

Tulpina de *Zymomonas* studiată s-a dezvoltat în condiții aerobe ceva mai slab decât în condiții anaerobe, dar nici de această dată nu a produs celulază. Se poate trage concluzia că ea nu este producătoare de celulază în condițiile de mediu de cultură studiate de noi[157].

VII.4.2.3. Celulaze produse de microorganismele din rumen

Nu există date de literatură care să certifice utilizarea microorganismelor din rumen pentru obținerea industrială de celulaze sau direct pentru hidroliza materiilor prime lignocelulozice. Acest lucru se datorează probabil condițiilor mai dificile pentru a cultiva aceste microorganisme *in vitro*.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul VII.10., iar pe baza valorilor activităților și a glucozei rămase neconsumate din acest tabel, s-a construit graficul din figura VII.6.

Tabelul VII.10 . Activitatea celulazică și conținutul total de proteine în culturile de *Butyrivibria fibrisolvens*

Timp [ore]	Sursă de carbon	Glucoză(mg)	Activitate[U/ml]	Proteine[mg/ml]
24	Celuloza 2 g/l	7,972	9,885	0,495
48		5,338	30,90	0,529
144		3,477	0,644	0,664

Acest microorganism s-a comportat în mod asemănător ca *Trichoderma*, în sensul că a produs cea mai mare cantitate de celuloză după 48 de ore și apoi activitatea celulazică s-a redus foarte mult. Cantitatea de proteină a înregistrat o creștere constantă pe întreaga durată a celor 6 zile de cultură, ceea ce arată că mediul de cultură utilizat a fost adecvat din punct de vedere al asigurării factorilor nutritivi necesari.

Glucoza nu a fost consumată în întregime, ceea ce demonstrează că mai existau resurse de creștere a biomasei, însă acest lucru nu prezintă importanță în condițiile în care noi am fost interesați doar de producerea de celuloză. *Butyrivibria fibrisolvens* s-a dovedit a fi un microorganism care se poate dezvolta atât în condiții aerobe cât și anaerobe, însă în condiții aerobe a produs o cantitate mai mare de enzimă. De asemenea, activitatea enzimatică a fost mai mare decât cea înregistrată în culturile de *Trichoderma*. Și în acest caz, este important ca activitatea enzimatică să fie monitorizată permanent și cultura să fie oprită atunci când ea a ajuns la valoarea maximă, înainte de a începe degradarea celulozei[158].

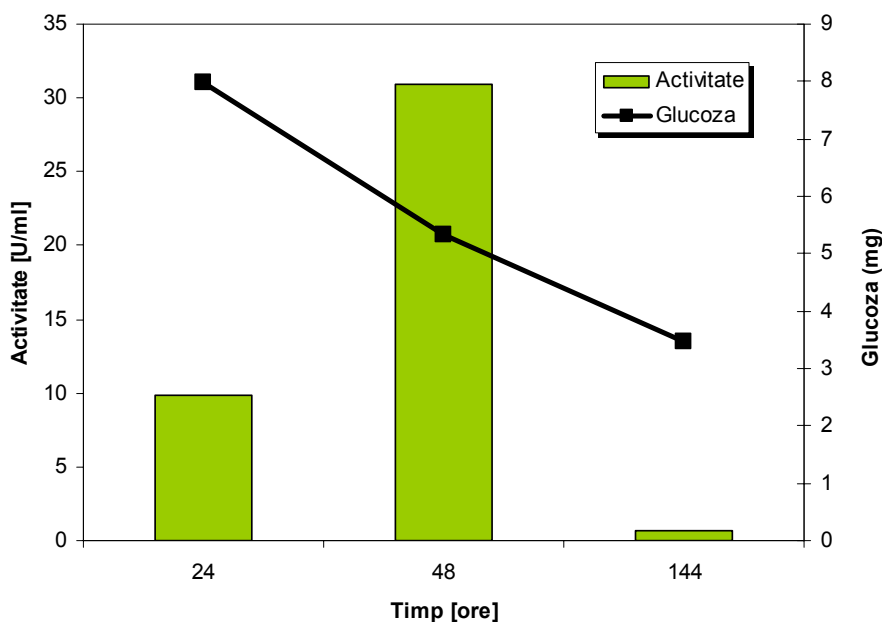


Figura. VII.6. Evoluția în timp a activității celulozei produse de *Butyrivibria fibrisolvens* și a cantității de glucoză

VII.5. Efectuarea hidrolizei celulozei cu ajutorul enzimelor

Pentru hidroliza celulozei au fost utilizate doua enzime: Accelerase 1000 de la Genencor și Celluclast 1.5L de la Novozyme. Au fost investigați parametrii care influențează reacția de hidroliză: tipul de biomasă, raportul enzimă, substratul, temperatura și pH-ul.

Modul de lucru general

S-a lucrat în vase de sticlă cu capacitatea de 50 cm³, care fac parte din multireactorul modular OmniStation. Vasele de reacție au fost termostatate la 40°C sau 60°C și sub agitare magnetică s-au introdus 100 mg rumeguș pretratată cu H₂SO₄ 0,82% (Plop, Salcâm, Stejar, Brad sau Amestec), 10 ml tampon acetat de pH=4,8 sau 6,0 și 10-50 μl enzimă (Celluclast 1.5L din *Trichoderma reesei* ATCC 26921 de la Novozyme sau Accellerase™ 1000 de la Genencor). Momentul adăugării enzimei a fost considerat momentul zero al reacției. Pentru a urmări evoluția reacției de hidroliză au fost prelevate probe de 200 μl la intervale stabilite, iar în aceste probe au fost determinate zaharurile totale (exprimate ca glucoză), prin metoda spectrofotometrică cu acid 3,5-dinitrosalicilic, astfel:

- în două eprubete s-au pipetat:

Proba:

0,2 ml probă
0,6 ml soluție DNS 1%

Martor:

0,2 ml tampon acetat de pH=4,8 sau pH=6,0
0,6 ml soluție DNS 1%

- s-au fiert ambele eprubete 5 minute pe baia de apă după care s-a adăugat în fiecare eprubetă 4 ml apă distilată și s-a citit extincția probei față de martor la λ=540 nm.

- cantitatea totală de zaharuri (exprimată ca glucoză) care a fost eliberată prin hidroliza enzimatică în intervalul de timp considerat până în momentul luării probei, s-a calculat cu relația:

$$C_G = \frac{(E_p + 0,01333) \cdot 10}{0,27649} \text{ [mg glucoza]} \quad (\text{VII.6.})$$

unde 10 reprezintă volumul amestecului de reacție (10 ml)

VII.5.1. Influența naturii substratului și raportului enzimă:substrat

Modul de lucru

Toate experimentele au fost realizate folosind 100 mg probe de biomasă lignocelulozică de diferite proveniențe și 10 ml soluție tampon. La acest amestec s-au adăugat volume diferite de soluție enzimatică, de la 10 la 50 μl, ceea ce înseamnă că raportul enzimă: substrat a fost între 0,1-0,5 ml/g. Dacă ținem cont de activitatea enzimelor care a fost determinată anterior:

- pentru Accelerase 1000: 88,9 CMC U/ml

- pentru Celluclast 1.5L: 83,1 CMC U/ml

rezultă că s-au introdus în amestecul de hidroliză între 0,89-4,44 unități Accelerase 1000, respectiv 0,83-4,15 unități Celluclast 1.5L.

Toate tipurile de biomasă au fost pretratate cu acid sulfuric 0,82%, sub acțiunea microundelor. Biomasă, după pretratament a fost filtrată, spălată de mai multe ori cu apă și uscată la temperatură moderată. Au fost studiate calități de biomasă provenite fie din esențe tari (stejar, salcâm), fie din esențe moi (plop, brad) de lemn. În condițiile în care creșterea cantității de glucoză eliberată a fost mai mică, s-au luat probe numai din oră în oră, timp de 7 ore, urmată de o probă finală după 24 de ore. Ținând cont de reducerea previzibilă a vitezei de reacție, pentru acest studiu s-a utilizat raportul maxim enzimă:substrat de la studiul precedent, adică 0,5 ml/g. Temperatura de reacție a fost 40°C iar pH-ul 4,8.

Primele studii au fost realizate folosind ca substrat celuloză microcristalină pură, de tip Avicel PH 101, cu o granulație medie de 50 μm, pentru a avea o referință în ceea ce privește comportarea enzimelor, în sistemul de reacție stabilit. Experimentele au fost realizate la temperatura de 40°C și pH 5,8. Rezultatele sunt prezentate în tabelele VII.11 și VII.12.

Tabelul VII.11. Hidroliza celulozei Avicel cu diferite concentrații de Accelerase 1000

Timp (min)	Raport enzimă/substrat				
	0,1 ml/g	0,2 ml/g	0,3 ml/g	0,4 ml/g	0,5 ml/g
	Glucoză eliberată (mg)				
30	9,67	17,84	16,18	21,12	23,14
60	14,27	24,98	27,26	33,83	33,62
90	20,82	28,29	30,17	39,79	41,74
120	23,45	16,97	14,51	22,04	25,98
180	34,56	46,51	41,97	62,45	49,04
240	20,89	31,17	46,13	37,21	61,67
360	47,31	63,88	72,02	84,81	88,38
1440	71,69	93,5	93,20	106,2	110,7

Tabelul VII.12. Hidroliza celulozei Avicel cu diferite concentrații de Celluclast 1.5L

Timp (min)	Raport enzimă/substrat				
	0,1 ml/g	0,2 ml/g	0,3 ml/g	0,4 ml/g	0,5 ml/g
	Glucoză eliberată (mg)				
30	7,16	10,18	12,48	15,29	16,72
60	12,55	15,92	17,20	21,85	23,59
90	19,03	19,34	25,14	28,70	30,52
120	19,89	22,23	26,95	31,92	30,67
180	26,0	33,99	32,92	46,56	40,55
240	29,05	31,46	37,60	46,62	43,68
360	33,70	46,62	40,78	46,38	55,37
1440	60,19	63,85	82,21	79,54	88,56

Pentru a ilustra mai bine evoluția reacției în timp au fost construite graficele din figurile VII.7. și VII.8., unde s-au reprezentat cantitățile totale de glucoză eliberată în sistemul de reacție în primele șase ore ale reacției, la câte trei rapoarte enzimă/substrat.

Se poate observa că are loc creșterea cantității de glucoză formată în tot intervalul studiat, ceea ce demonstrează că nu avem inhibiție de produs. De asemenea, rezultă că prin creșterea raportului enzimă/substrat se obține și o creștere a vitezei de reacție. În condițiile în care prețul enzimei este ridicat, va fi necesară o optimizare a raportului enzimă/substrat pentru a avea performanțele maxime, la un preț de cost acceptabil.

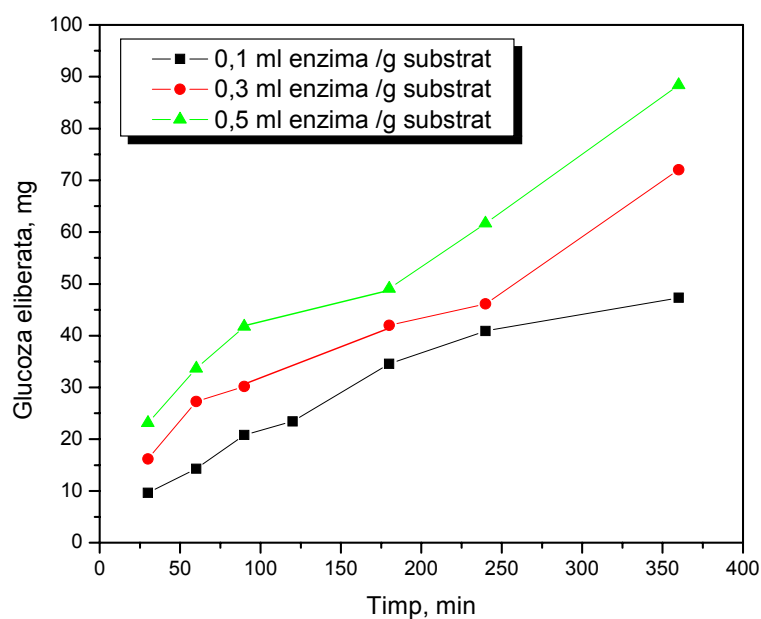


Figura VII.7. Evoluția în timp a hidrolizei celulozei Avicel la diferite concentrații de Accelerase 1000

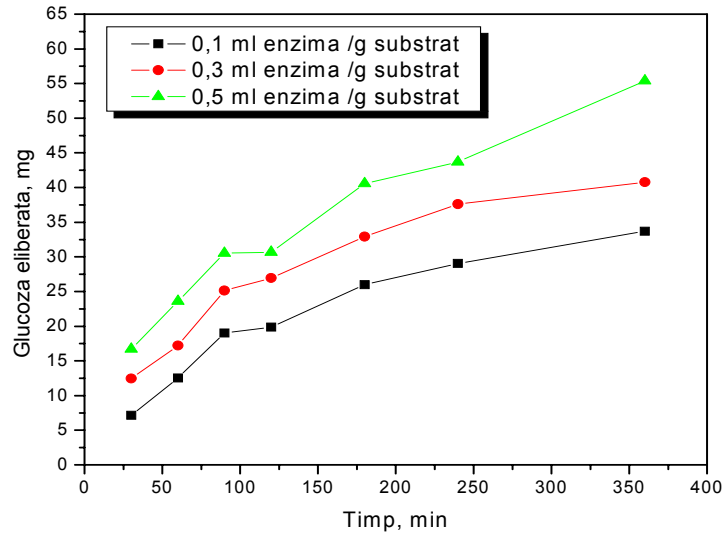


Figura VII.8. Evoluția în timp a hidrolizei celulozei Avicel la diferite concentrații de Celluclast 1.5L

În figura VII.9. este ilustrată cantitatea de glucoză formată în funcție de timp pentru diferitele tipuri de biomasă studiate. Se observă că proba pretrată din stejar și plop este hidrolizată cu eficiență mai mare decât cea provenită din salcâm și brad. Nu există așadar o specificitate mai mare față de esențele tari, singura evidență fiind viteza de hidroliză, considerabil mai mică pentru proba din brad, care probabil este valabilă și pentru alte conifere. Se mai poate observa că eficiența enzimei față de biomasa pretrată este considerabil mai mică decât față de celuloza pură (Avicel), ceea ce se explică pe de o parte prin faptul că Avicelul a avut o granulație foarte fină, în timp ce biomasa a fost mărunțită doar grosier, iar pe de altă parte substratul de biomasă pretrată mai conține lignina și alți compuși inhibitori ai acțiunii celulazice. Se pare că lignina nu are o acțiune inhibitoare propriu-zisă, dar ea adsoarbe enzima care nu mai poate hidroliza în condiții corespunzătoare, celuloza.

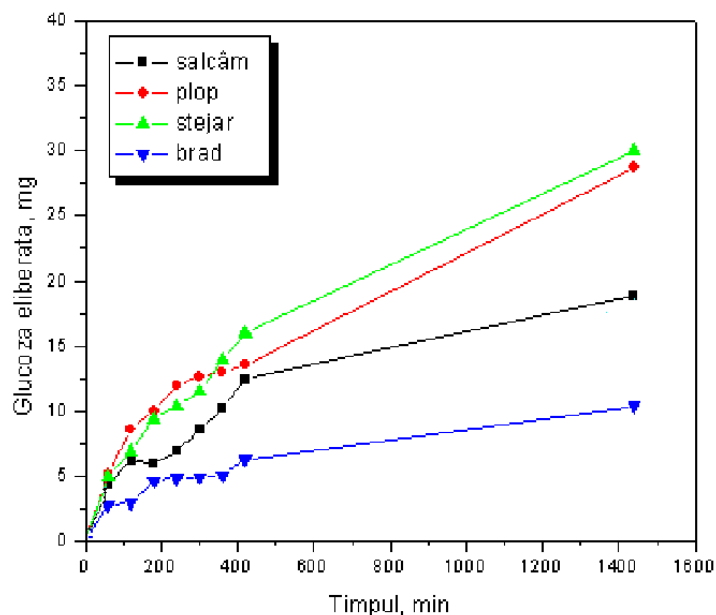


Figura VII.9. Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H_2SO_4 0,82%, folosind complexul celulazic Accelerase 1000, la $40^\circ C$

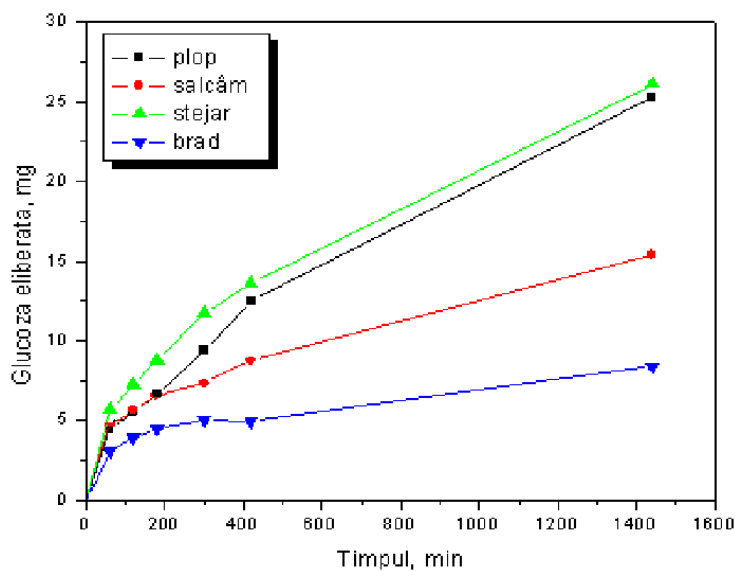


Figura VII.10. Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H_2SO_4 0,82%, folosind Celluclast 1.5L, la $40^\circ C$

Comparativ cu enzima Accelerase, în figura VII.10., se observă că și în acest caz gradul de hidroliză este mai mare dacă substratul este stejar sau plop, apoi

salcâmul este hidrolizat cu aproximativ aceeași viteză ca și amestecul, iar lemnul de brad se caracterizează prin cea mai mare rezistență față de hidroliza cu celuloze. Per ansamblu se confirmă ceea ce s-a remarcat și la substratul Avicel, adică un grad de hidroliză mai mic în aceleași condiții pentru Celluclast decât pentru Accelerase.

VII.5.2. Influența temperaturii

Pentru a studia influența temperaturii, au fost repetate reacțiile de hidroliză ale probelor pretratate cu Accelerase 1000 și Celluclast 1.5L, în aceleași condiții dar la temperatura de 60°C. Raportul enzimă/substrat a fost și în acest caz de 0,5 ml/g, considerând întreaga cantitate de biomasă pretrată, iar pH-ul de reacție a fost menținut la 4,8. Rezultatele sunt prezentate în figurile VII.11. și VII.12. unde s-a reprezentat evoluția cantității de glucoză eliberată în primele șapte ore de reacție, pentru câte două esențe (plop și brad).

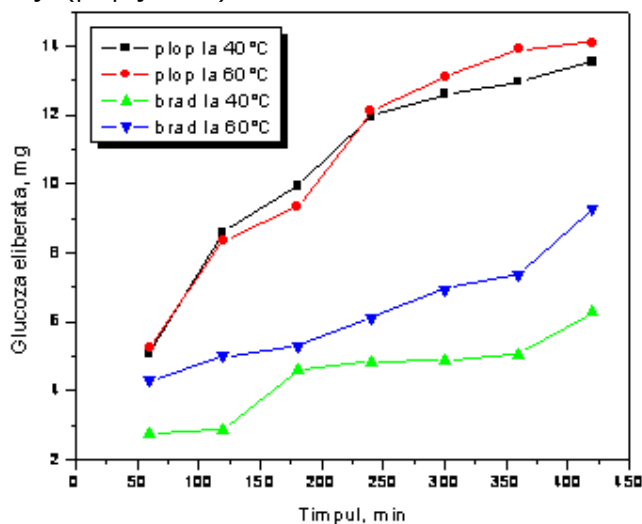


Figura VII.11. Dependența de temperatură a hidrolizei probelor de plop și brad pretratate cu H_2SO_4 0,82%, folosind complexul celulozic Accelerase 1000

În cazul enzimei Accelerase 1000 pentru proba de plop, diferența dintre valorile obținute la cele două temperaturi este mică, deci putem considera că în acest interval, nu temperatura este factorul cel mai important care influențează reacția. Există o serie de alți factori mai greu cuantificabili, așa cum este cristalinitatea celulozei, care pot avea influență decisivă, împiedicând ca viteza să crească odată cu creșterea temperaturii, așa cum se întâmplă în general la reacțiile enzimatiche. La proba de brad pretrată, care se hidrolizează mai greu, influența temperaturii este mai pronunțată și gradul de conversie a biomasei la zaharuri reductoare este de aproape două ori mai mare după șapte ore, la temperatura de 60°C.

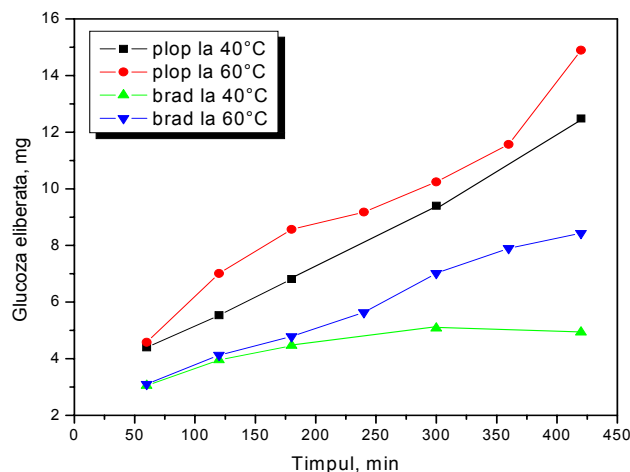


Figura VII.12. Dependența de temperatură a hidrolizei probei de plop și brad pretratate cu H_2SO_4 0,82%, folosind Celluclast 1.5L

Dacă s-a utilizat enzima Celluclast 1.5L, cantitatea de glucoză eliberată și deci gradul de conversie cresc atât în cazul hidrolizei probei de plop pretratată cât și în cazul celui de brad (figura VII.12.) Creșterea mai semnificativă s-a constatat și în acest caz atunci când s-a utilizat ca substrat tipul de probă față de care activitatea enzimei a fost mai mică și de asemenea se poate observa că în special la acest substrat, efectul de temperatură a fost mai pronunțat pe măsură ce reacția a avansat.

VII.5.3. Influența pH-ului

Deoarece se cunoaște faptul că pH-ul joacă un rol important în reacțiile enzimatice care au loc în medii apoase, s-a studiat și influența acestui parametru. Celulazele sunt considerate enzime stabile în special în intervalul de pH 5-6, de aceea în afară de studiile anterioare care au fost efectuate la pH 4,8, s-a mai efectuat un set de determinări și la pH 6, folosind de asemenea soluție tampon acetat. Ca substrat s-a utilizat probe pretratate de plop, salcâm și brad, iar temperatura de lucru a fost de 60°C. Rezultatele sunt prezentate în tabelul VII.13.

Tabelul VII.13. Hidroliza cu Accelerase 1000 a biomasei din rumeguș pretratată, la 60°C și pH 6,0

Timp (min)	Natura biomasei		
	plop	salcâm	brad
	Glucoză eliberată (mg)		
60	4,90	5,16	3,67
120	7,87	7,06	5,02
180	9,78	7,85	5,22
300	11,85	9,35	5,52
360	12,06	11,11	6,88
420	15,39	11,25	7,41
1440	30,60	19,21	12,15

Pentru a ilustra mai bine influența pH-ului asupra hidrolizei de biomasă, s-a realizat graficul din figura VII.13. unde este redată variația în timp a cantității de zaharuri eliberate la două valori de pH 4,8 și pH 6, pentru două substraturi, probe de salcâm și de brad, pretratate cu acid sulfuric 0,82%. Din acest grafic rezultă că activitatea celulelor este mai mare la pH 4,8 pentru ambele substraturi, deși diferențele nu sunt mari, în special în cazul probei de brad. Se poate trage concluzia că nu este necesar un control riguros al pH-ului în timpul procesului de hidroliză, eficiența catalitică a enzimelor fiind ridicată în tot intervalul de pH 4,8-6.

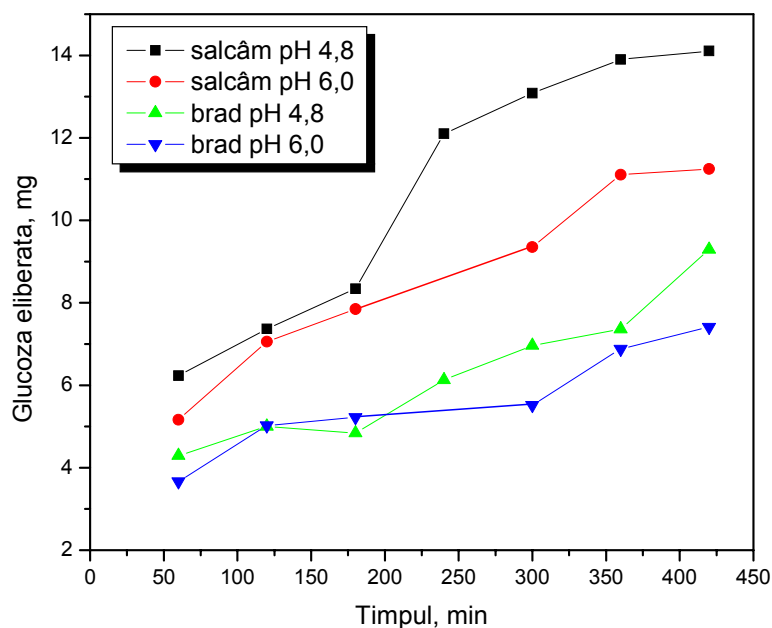


Figura VII.13. Dependența de pH a hidrolizei probelor de salcâm și brad pretratate cu H_2SO_4 0,82%, folosind Accelerase 1000

VII.6. Hidroliza enzimatică a materialelor pretratate

Pentru hidroliza enzimatică a materialelor pretratate prin liofilizare și microunde s-a lucrat în recipiente de sticlă cu capacitatea de 50 cm^3 , care fac parte din multireactorul modular OmniStation. Acestea au fost termostatate la 40°C sau 650°C și sub agitare magnetică s-au introdus 100 mg rumeguș pretratată cu H_2SO_4 0,82% (Câneapă, Stejar sau Brad), 10 ml tampon acetat de pH=4,8 și 50 μl enzimă (Accelerase™ 1000 de la Genencor sau Celluclast 1.5L din *Trichoderma reesei* ATCC 26921 de la Novozyme). Momentul adăugării enzimei a fost considerat momentul zero al reacției. Pentru a urmări evoluția reacției de hidroliză au fost prelevate probe de 200 μl la intervale stabilite, iar în aceste probe au fost determinate zaharurile totale (exprimate ca glucoză), prin metoda spectrofotometrică cu acid 3,5-dinitrosalicilic.

Toate experimentele au fost realizate folosind 100 mg probă de diferite proveniențe și 10 ml soluție tampon. La acest amestec s-au adăugat 50 μ l de soluție enzimatică, ceea ce înseamnă că raportul enzimă:substrat a fost de 0,5 ml/g.

S-a realizat un studiu de hidroliză folosind ca substrat biomasă pretrată provenită din rumeguș. Toate aceste tipuri de probe au fost pretratate cu acid sulfuric 0,82%, sub acțiunea microundelor. Biomasă după pretratament a fost filtrată, spălată de mai multe ori cu apă și uscată la temperatură moderată. Au fost studiate trei calități de biomasă sub formă de rumeguș, provenită fie din lemn de esență tare (stejar), fie din lemn de esență moale (brad), iar cel de-al treilea a fost cânepă. În condițiile în care creșterea cantității de glucoză eliberate a fost mai mică, s-au luat probe numai din oră în oră, timp de 8 ore, urmate de o probă finală după 24 de ore. Ținând cont de reducerea previzibilă a vitezei de reacție, pentru acest studiu s-a utilizat raportul maxim enzimă/substrat de la studiul precedent, adică 0,5 ml/g. Temperatura de reacție a fost 40°C, iar pH-ul 4,8[153].

În figurile VII.14 și VII.15, s-a reprezentat evoluția cantității de glucoză eliberată în primele șapte ore de reacție, pentru diferitele tipuri de biomasă studiate. Se observă că proba pretrată provenită din cânepă este hidrolizată cu eficiență mai mare decât cea provenită din stejar și brad. În ceea ce privește modul de prelucrare al biomasei înainte de pretratament (cernut sau măcinat), diferențe semnificative se observă numai în cazul biomasei din cânepă.

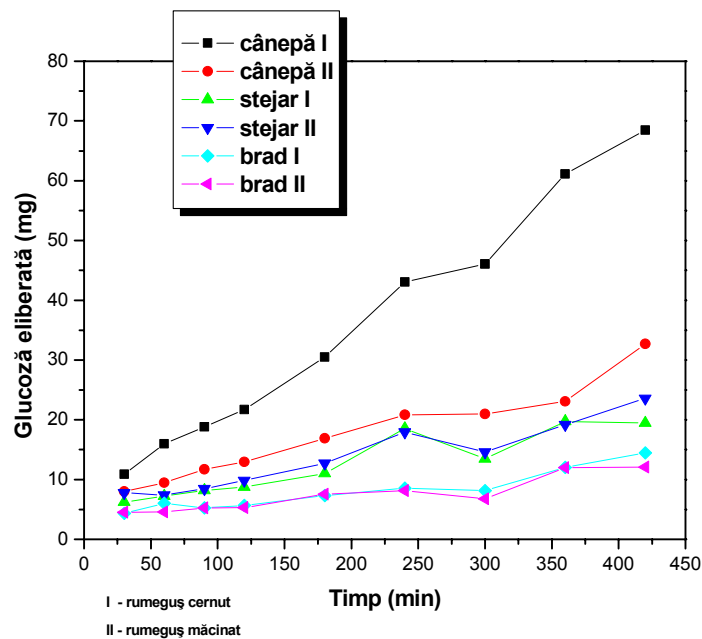


Figura VII.14. Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H_2SO_4 0,82%, folosind complexul celulazic Accelerase 1000, la 40°C

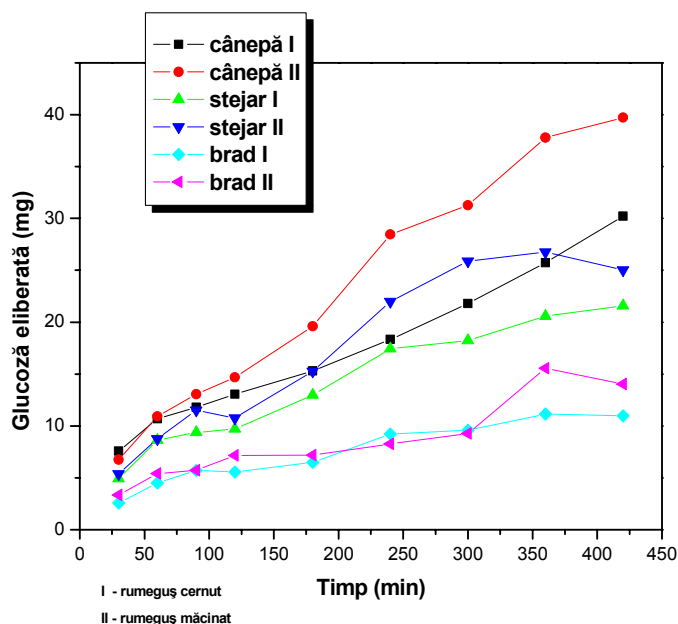


Figura VII.15. Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H_2SO_4 0,82%, folosind Celluclast 1.5L, la 40°C

Substratul de biomasă pretrată mai conține lignină și alți compuși inhibitori ai acțiunii celulazice. Se pare că lignina nu are o acțiune inhibitoare propriu-zisă, dar ea adsorb enzima care nu mai poate hidroliza în condiții corespunzătoare celuloza.

S-a demonstrat că albumina din ser de bovină (BSA) și alte proteine se adsorb competitiv și ireversibil pe lignină, ceea ce duce la creșterea eficienței catalitice a celulozei. În acest scop am utilizat BSA ca și aditiv la hidroliza enzimatică a biomasei cu Accelerase 1000, iar raportul BSA:substrat a fost de 1:2. Rezultatele sunt prezentate în tabelul VII.14, iar în figura VII.16. s-a reprezentat evoluția în timp a cantității de glucoză după 8 ore de hidroliză (cu/fără aditiv) pentru cele trei tipuri de probe studiate.

Tabelul VII.14. Hidroliza cu Accelerase 1000 a biomasei pretratate, la 50°C cu sau fără adaos de albumină

Timp (min)	Natura biomasei					
	CÂNEPĂ (II + A)	STEJAR (II + A)	BRAD (II + A)	CÂNEPĂ (II)	STEJAR (II)	BRAD (II)
	Glucoză eliberată (mg)					
60	17,65	11,21	10,01	11,44	9,22	7,19
120	24,85	14,48	13,28	13,7	13,0	8,68
180	26,41	16,91	13,31	17,01	17,60	6,74
240	29,74	24,04	20,80	21,51	17,86	10,4
360	35,95	28,38	25,0	23,89	21,32	10,6
480	47,47	31,25	30,0	22,87	27,92	15,23
1440	58,30	45,23	34,0	44,49	56,17	25,73

II + A - proba măcinată + ALBUMINĂ

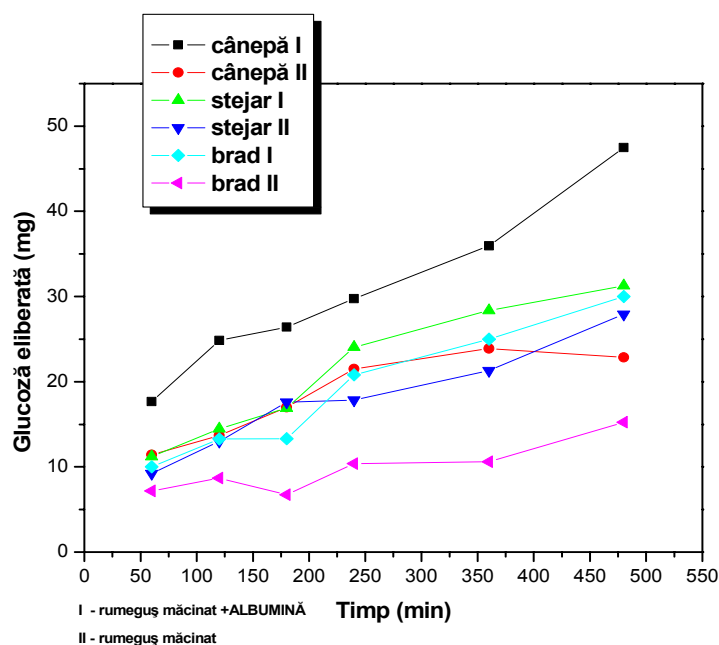
II - proba măcinată

Tabelul VII.15. Cantitatea de proteină din soluția rezultată la hidroliza cu Accelerase 1000 a biomasei pretratate, la 50°C cu adaos de albumină

Timp (min)	Natura biomasei		
	CÂNEPĂ (II + A)	STEJAR (II + A)	BRAD (II + A)
Cantitate proteină (mg/ml)			
60	3,34	3,96	3,92
120	3,52	2,69	4,30
180	3,63	4,17	4,26
240	3,19	3,80	3,89
360	4,56	4,41	6,62
480	4,63	5,50	5,20
1440	3,09	4,43	5,19

II + A - proba măcinată + ALBUMINĂ

II - proba măcinată

**Figura VII.16.** Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82%, folosind complexul celulazic Accelerase 1000 și 50 mg BSA, la 50°C

Prin adaosul de BSA la hidroliza enzimatică a biomasei utilizate s-a obținut o creștere a cantității de glucoză eliberată de aproximativ 2 ori în cazul probei de cânepă și brad și de 1,2 ori pentru cel din stejar.

A fost efectuat un set de determinări cu biomasă liofilizată cu soluție NaOH 1% sau HCl 1% la -52°C timp de 25 ore (metoda 2). Rezultatele obținute în urma hidrolizei enzimatică cu Accelerase 1000 sunt prezentate în figura VII.17.

Dintre tipurile de probe studiate, cea de cânepă liofilizată cu soluție NaOH 1%, a dat cele mai mari cantități de glucoză.

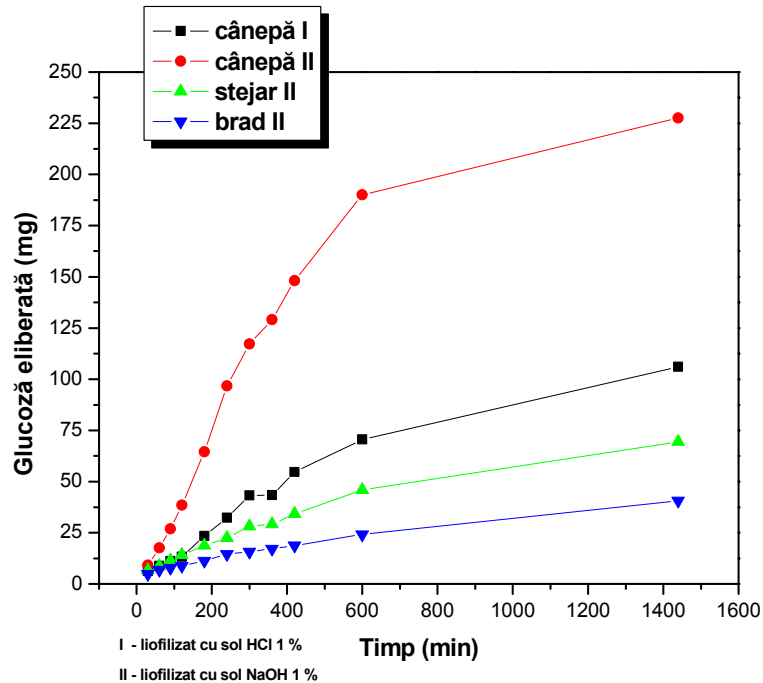


Figura VII.17. Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă liofilizată (cu sol NaOH 1% sau HCl 1% la -52°C timp de 25 ore), folosind complexul celulazic Accelerase 1000, la 40°C

S-a efectuat un alt set de determinări cu probe pretratate (metoda 2), iar rezultatele sunt prezentate în diagramele VII.18. și VII.19. Indiferent de tipul complexului enzimatic utilizat, se observă aceeași tendință de creștere a cantității de glucoză formată după 8 ore de reacție, valorile crescând în ordinea: brad, stejar, cânepă.

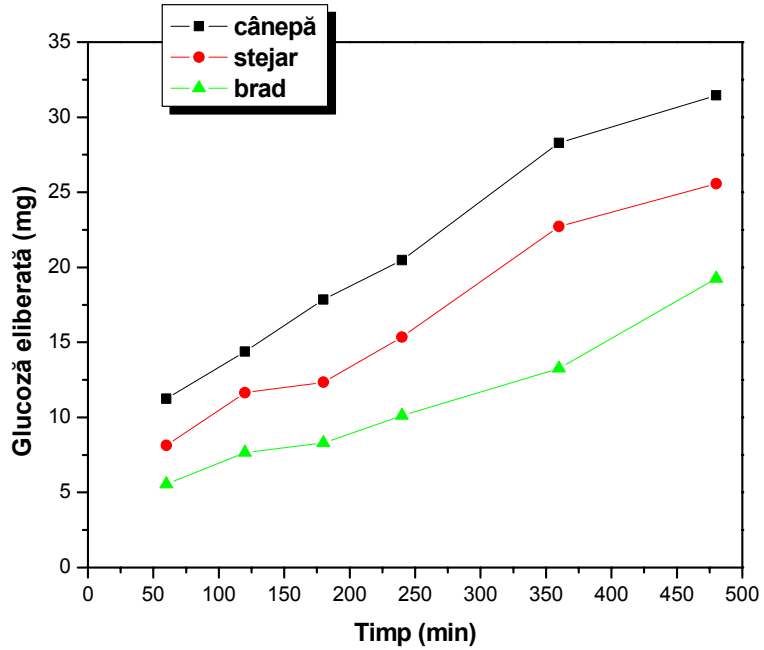


Figura VII.18. Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H_2SO_4 0,82% (program temperatură: 120-160°C, timp de 10 min), folosind complexul celulazic Accelerase 1000 la 40°C

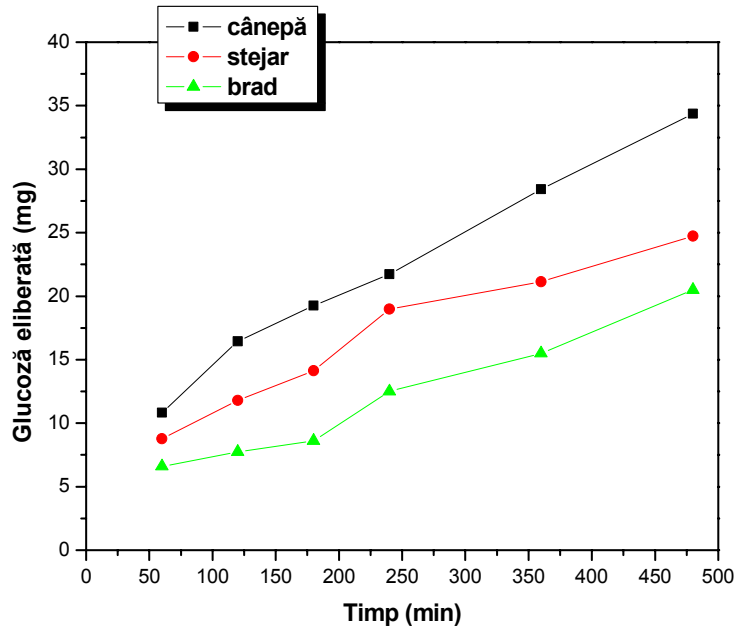


Figura VII.19. Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H_2SO_4 0,82% (program temperatură: 120-160°C, timp de 10 min), folosind Celluclast 1.5L, la 40°C

În cadrul acestei metode de pretratare (Metoda 3) sub influența microundelor în mediu acid s-a studiat influența temperaturii și timpului asupra eficienței procesului de pretratare în cazul celor trei tipuri de biomasă lignocelulozică studiată

Utilizând Accelerase 1000, respectiv Celluclast 1.5L s-a realizat hidroliza enzimatică a biomasei pretratate la temperatura de 40°C și pH 4,8. Rezultatele sunt prezentate în diagramele VII.20., VII.21. și VII.22.

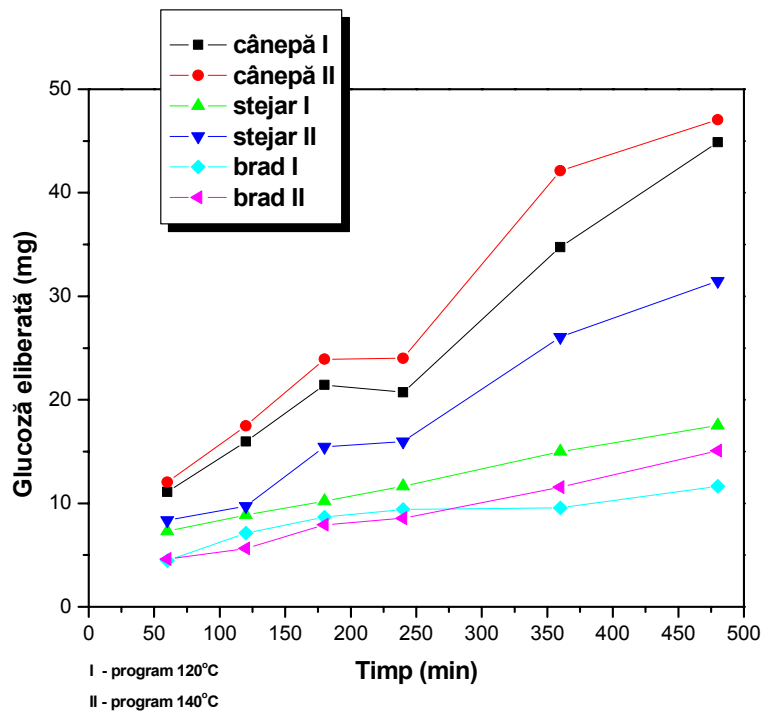


Figura VII.20. Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomasă pretrată cu H₂SO₄ 0,82% (program temperatură: 120 și 140°C, timp de 30 min), folosind complexul celulazic Accelerase 1000 la 40°C

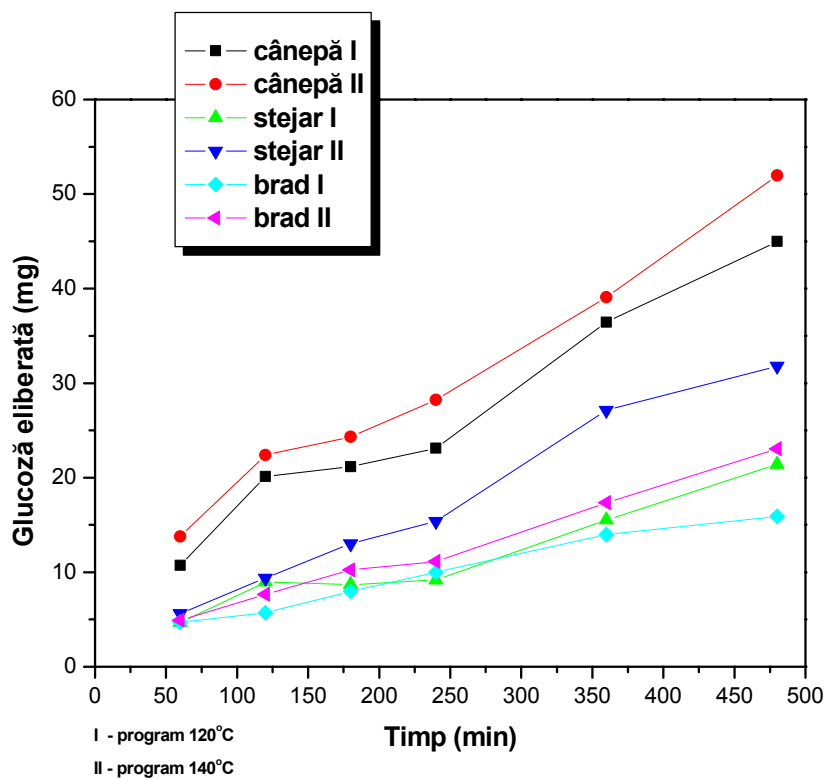


Figura VII.21. Evoluția în timp a hidrolizei diferitelor tipuri de biomă pretrată cu H_2SO_4 0,82% (program temperatură: 120 și 140°C, timp de 30 min), Celluclast 1.5L, la 40°C

Din figurile VII.20. și VII.21 nu se observă diferențe semnificative între cele două complexe enzimatică în ceea ce privește cantitatea de glucoză eliberată.

Utilizând un program de temperatură izoterm, gradul de hidroliză este mai mare dacă substratul este câneță iar stejarul este hidrolizat cu aproximativ aceeași viteză sau chiar mai mare decât bradul. Diferența dintre valorile obținute la cele două temperaturi este mare pentru proba de câneță și stejar iar la cea din brad, influența temperaturii de pretratare nu este așa de pronunțată.

Dacă se urmărește hidroliza substratului de câneță pretrată (figura VII.22.) se poate observa influența pozitivă a temperaturii de pretratament, obținându-se o cantitate de glucoză cu aproximativ 8% mai mare la 160°C decât la 120°C.

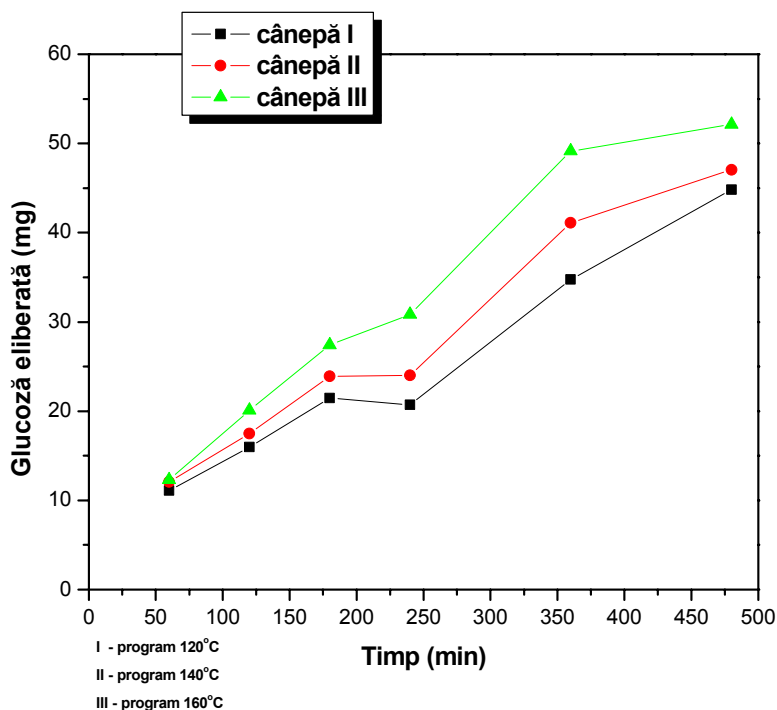


Figura VII.22. Evoluția în timp a hidrolizei biomasei de cânepă pretrată cu H_2SO_4 0,82% (program temperatură: 120, 140 și 160°C, timp de 30 min), folosind complexul celulazic Accelerase 1000 la 40°C

VII.7. Studiul comparativ asupra eficienței tipurilor de microorganisme utilizate în sinteza producerii bioetanolului

VII.7.1. Obținerea enzimelor de degradare a celulozei și hemicelulozei din culturi de microorganisme

Celulaze din *Trichoderma reesei* și *Zymomonas mobilis* Culturile au fost incubate pentru o perioadă de cateva zile la temperature de 30°C, în lipsa agitării, în condiții aerobe și anaerobe. La intervale variate de timp, au fost prelevate probe pentru analiza activității celulozei asupra substratului samples (carboximetil celuloza standard) și de asemenea pentru determinarea conținutului de protein[155].

VII.7.2. Degradarea celulozei de catre enzimele obținute din *Trichoderma reesei*

Tulpinile de *Trichoderma* au fost inoculate într-un mediu de cultură natural care

conținea 100 ml extract de cartofi, 2 g de glucoză și respectiv 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 și 2.0 g Avicel. Culturile au fost sterilizate într-o autoclavă, inoculate și termostatate pentru câteva zile la 30°C. Mostre de câțiva mililitri au fost prelevate pentru a determina conținutul total de zahar[157].

VII.7.3. Fermentarea zahărului cu enzime din *Zymomonas mobilis*

S-au folosit culturi de *Zymomonas* într-un mediu sintetic. Mediul sintetic de cultură a fost obținut din 0.5 g extract de drojdie, 0.1 g (NH₄)₂SO₄, 0.2 g K₂HPO₄, 0.1 g MgSO₄, 2.0, 4.0, 6.0 și respectiv 8.0 g glucoză. Culturile au fost sterilizate ca în cazul tulpinilor de *Trichoderma*[157].

VII.7.4. Determinarea conținutului total de zahar

Conținutul total de zahar a fost evaluat aplicând metoda colorimetrică pentru determinarea zaharurilor reducătoare cu reactiv DNS (acid 3,5-dinitrosalicilic). Conținutul total de zahăr s-a stabilit cu ajutorul ecuației (VII.7.).

$$\text{Zaharuri totale} = [(A_{540} + 0.07447) / 1.22612] \times \text{factor de diluție} \quad (\text{VII.7.})$$

unde: A₅₄₀ – Absorbanta (extincția) la 540 nm
factor de diluție – 5

Determinarea conținutului total de zahar - Conținutul total de glucoză obținute din culturi de *Trichoderma reesei* și *Zymomonas mobilis*, ambele în condiții anaerobe și aerobe, este prezentat în figurile VII.3. și VII.5 și tabelele VII.6 și VII.9.

Degradarea substratului celulozic cu enzimele obținute din *T. reesei* a fost cuantificată prin determinarea conținutului de zahăr din mediul de cultură, la intervale de timp diferite. Prin comparație, au fost calculate cantitățile teoretice care puteau fi obținute din degradarea celulozei, cu un randament de 100% [155]. Datele din tabelele VII.16. și VII.17. au fost utilizate pentru calculul randamentului hidrolizei enzimatică a celulozei în zaharuri, rezultate și prezentate în figura VII.23.

Tabelul VII.16. Concentrațiile maxime teoretice ale zaharurilor totale și etanolului, considerând eficiența maximă a proceselor de hidroliză și fermentare

Nr. de culturi	Concentrația inițială de celuloză (g/l)	Concentrația teoretică de zaharuri (g/l)	Concentrația teoretică de etanol (g/l)
1	5	43.21	22.08
2	7.5	45.41	23.21
3	10	47.61	24.33
4	15	52.01	26.58
5	20	56.41	28.83

Tabelul VII.17. Rezultatele de hidroliză a celulozei în zaharuri fermentabile datorită enzimelor obținute din *Trichoderma reesei*

Nr. de culturi	Concentrația inițială de celuloză (g/l)	Timp (ore)	Concentrația totală de zaharuri (g/l)	Randament de zaharuri (%)
1	5	24	22.19	51.3
		48	24.84	57.5
		72	30.19	69.8
		96	28.17	65.2
2*	5	24	28.05	64.9
		48	29.60	68.5
		72	30.23	70.0
		96	28.20	65.3
3	7.5	24	25.91	57.1
		48	28.08	61.8
		72	31.36	69.1
		96	29.87	65.8
4*	7.5	24	27.55	60.7
		48	26.12	57.5
		72	29.44	64.8
		96	29.11	64.1
5	10	24	29.70	62.4
		48	28.08	58.9
		72	28.64	60.1
		96	31.01	65.1
6*	10	24	28.08	58.9
		48	23.35	49.0
		72	32.32	67.9
		96	28.89	60.7
7	15	24	20.11	38.7
		48	19.83	38.1
		72	26.40	50.8
		96	23.74	45.6
8*	15	24	25.15	48.4
		48	23.53	45.2
		72	31.04	59.7
		96	30.49	58.6
9	20	24	34.18	60.6
		48	30.85	54.7
		72	30.0	53.2
		96	31.13	55.2
10*	20	24	25.05	44.4
		48	25.18	44.6
		72	28.16	49.9
		96	29.54	52.4

* - S-au folosit cinci culturi (în duplicat) de *Trichoderma reesei*.

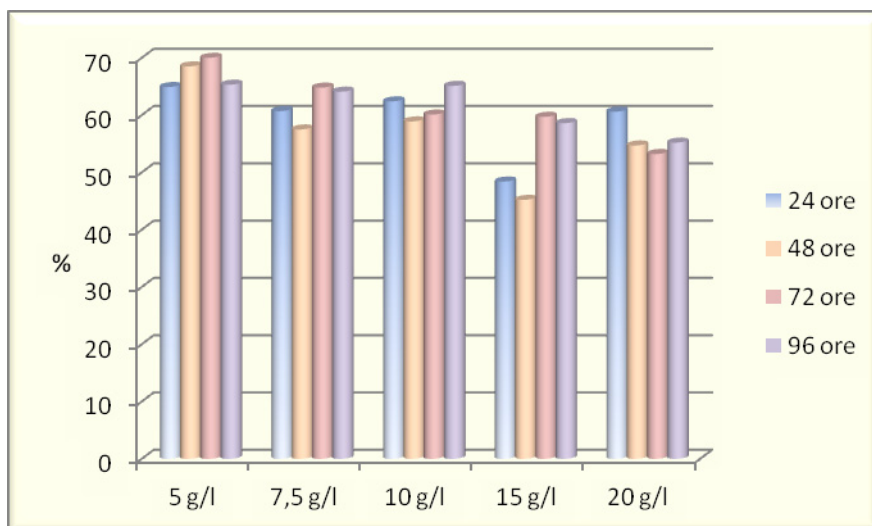


Figura VII.23 Randamentul de zaharuri totale obținute din celuloză (sunt prezentate cele mai bune rezultate pentru fiecare cultură duplicat)

După cum se observă, cele mai bune rezultate sunt obținute pentru mediile de cultură cu conținut redus de celuloză (valori mai ridicate sunt obținute pentru metodele în care s-a folosit o concentrație inițială de celuloză de 5, 7.5 și 10 g/l). Randamentul maxim în cazul transformării celulozei în glucoză este de 70% și este obținut pentru o concentrație a substratului de celuloză de 5 g/l și un timp de inoculare de 72 ore. O creștere a timpului de reacție conduce (exceptând cazul substratului cu conținutul cel mai mare de celuloză) la rezultate mai bune în concentrațiile de zaharuri fermentabile[157].

Din procesul de fermentare al glucozei cu *Zymomonas mobilis* au rezultat cantități mici de zaharuri nefermentabile. Se poate observa de asemenea că cele mai bune rezultate sunt obținute pe parcursul unui timp mai îndelungat de reacție (48-96 ore) și când este aplicată agitarea.

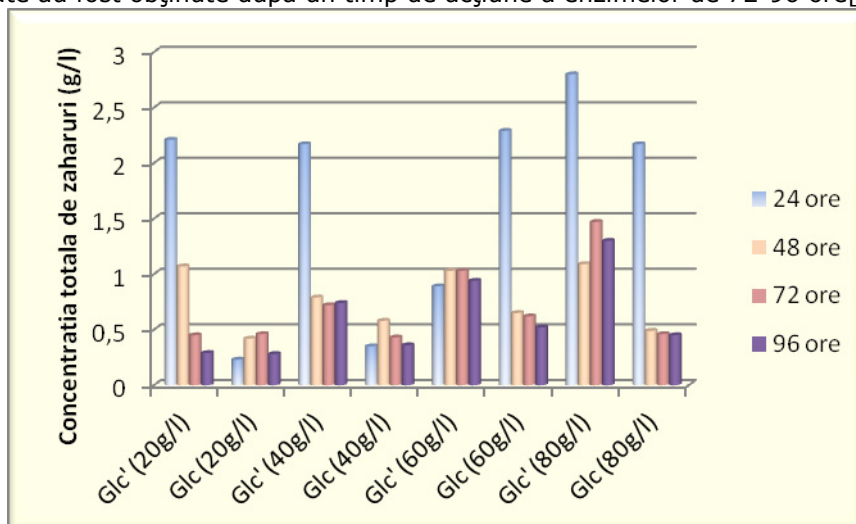
Tabelul VII.18. Conținutul total de zahăr obținut experimental și concentrația de etanol calculate teoretic la fermentarea zaharurilor cu *Zymomonas*

Nr. de culturi	Concentrația inițială de glucoză (g/l)	Timp (ore)	Concentrația totală de zaharuri (g/l)	Concentrația teoretică de etanol (g/l)
1*	20	24	2.21	9.09
		48	1.07	9.67
		72	0.45	9.99
		96	0.29	10.02
2	20	24	0.23	10.10
		48	0.42	10.00
		72	0.46	10.00
		96	0.28	10.02
3*	40	24	2.17	19.33
		48	0.79	20.04
		72	0.72	20.08

		96	0.74	20.06
4	40	24	0.35	20.26
		48	0.58	20.15
		72	0.43	20.22
		96	0.36	20.26
5*	60	24	0.89	30.21
		48	1.03	30.14
		72	1.03	30.14
		96	0.94	30.19
6	60	24	2.29	29.50
		48	0.65	30.33
		72	0.62	30.35
		96	0.52	30.40
7*	80	24	2.80	39.50
		48	1.09	40.33
		72	1.47	40.14
		96	1.30	40.22
8	80	24	2.17	39.78
		48	0.49	40.64
		72	0.46	40.65
		96	0.45	40.65

*agitat la 150 rot/min

Tabelul VII.18. arată conținutul de zaharuri netransformate după fermentarea glucozei în prezența a *Z. mobilis* și pornind de la aceste valori experimentale s-a calculat randamentul teoretic de etanol. Rezultatele prezentate în figura VII.24. arată că independent de concentrația substratului, cele mai bune rezultate au fost obținute după un timp de acțiune a enzimelor de 72-96 ore[157].



* agitat la 150 rot/min

Figura VII.24. Conținutul total de zahăr după fermentarea glucozei cu *Zymomonas mobilis* (în funcție de concentrația inițială introdusă în mediu)

VII.7.5. Degradarea celulozei de către enzimele obținute din *Trichoderma reesei* și *Zymomonas mobilis*

Au fost întrebuințate culturi de *Trichoderma* și *Zymomonas* în mediu natural. Cultura din mediul natural conține 100 ml extract de cartofi, 2 g glucoză și 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 și respectiv 4.0 g Avicel. Procedura de sterilizare a culturilor este identică cu cea prezentată în cazul anterior.

O serie de substraturi celulozice au fost supuse acțiunii simultane a *Trichoderma reesei* și *Zymomonas mobilis* timp de 30 de zile. Rezultatele sunt prezentate în tabelul VII.19 și figura VII.25.

Tabelul VII.19. Conținutul total de zahăr la acțiunea amestecului *t. reesei* – *z. mobilis* asupra substraturilor celulozice

Nr. de culturi	Concentrația inițială de glucoză (g/l)	Timp (zile)	Conținutul total de zaharuri (g/l)	Concentrația teoretică de etanol (g/l)
1	10.0	30	1.077	23.78
2	15.0	30	1.091	26.03
3	20.0	30	1.110	28.77
4	30.0	30	1.112	32.76
5	40.0	30	1.065	37.28

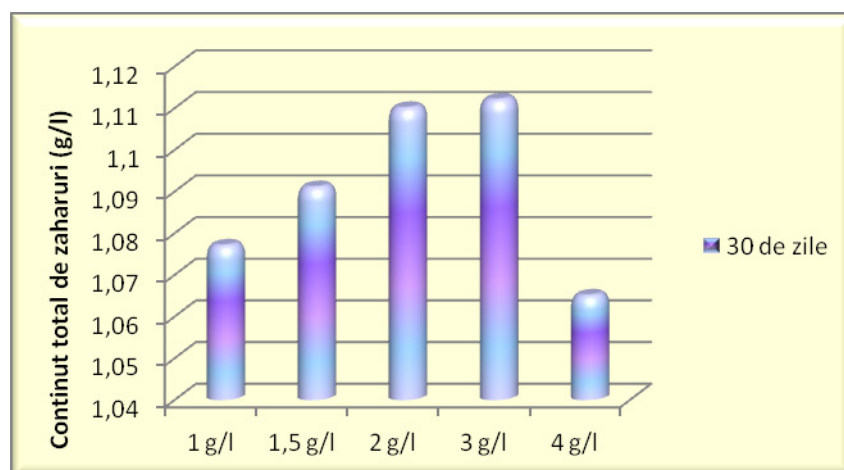


Figura VII.25. Conținutul total de zaharuri netransformate după acțiunea amestecului *t. reesei* – *z. mobilis*

Rezultatele nu arată diferențe semnificative în ceea ce privește conținutul total de zaharuri netransformate, independent de concentrația inițială a celulozei. Se pare că, în acest caz, concentrațiile inițiale mai mari de celuloză au influență pozitivă asupra cantităților totale de zaharuri fermentate[157].

VII.8. Studiul comparativ al influenței tipurilor de pretratare a biomasei lignocelulozice asupra eficienței hidrolizei enzimatică

Pentru acest studiu s-a utilizat biomasa lignocelulozică ce a fost cernută pe o sită vibrantă digital (filtrarea) electromagnetic și are următoarele dimensiuni: de cânepă (1,7 mm, dimensiunea ochiului de plasă), stejar (0,85 dimensiune a ochiurilor de plasă mm) și brad (1,7 mm, dimensiunea ochiului de plasă). Rumeșul lignocelulozic a fost albit de un dispozitiv electric pentru suport lignocelulozic și are dimensiunea următoare (0,9 mm, dimensiunea ochiului de plasă). Reactivii au fost achiziționați de la furnizorii de produse chimice și utilizați fără purificare suplimentară. Catalizatorul enzimatic constă din celulază complex de Accellerase™ 1000 achiziționate de la Genencor Accellerase™.

VII.8.1. Pretratarea biomasei

Metoda A - pretratare liofilizare alcalină

Suspensiile de biomasă lignocelulozică albită și uscată (10 ml), (cânepă, stejar și brad, respectiv), în NaOH 1%, au fost liofilizate de la -52°C pentru 25 de ore, folosind un Ilshin TFD8503 lyophilizer. Probele liofilizate rezultate au fost spălate cu apă ultrapură (25 ml), filtrate și neutralizate cu H₂SO₄ de 0,82%.

Metoda B - Pretratarea acidă în cuptorul cu microunde

O suspensie biomasă lignocelulozică (cernută sau albită) și H₂SO₄ 0,82% (10% materie uscată, w / w) a fost încălzită la microunde TMMVS-2 cu sistem Berghof (P = 1000 W), în următoarele condiții de temperatură: 150°C timp de 10 minute, cu un cuptor cu microunde de putere: 500 W. Suspensiile au fost racite, apoi filtrate, iar rumeșul a fost spălat pe filtru cu apă distilată și apoi uscat în vid, la 60°C.

VII.8.2. Hidroliza enzimatică a biomasei pretratate

Reacțiile de hidroliză au fost efectuate pe vase de sticlă de 50 cm³, prioritar cu un termostat la 40 ° C.

Sub agitare magnetică, au fost pretratate 100mg de biomasă, soluție tampon 10 ml acetat (pH = 4.8) și 50 μl enzimă celulază complex de Accellerase™ 1000. Raportul de enzimă: substratul a fost de 0,5 ml / g. Momentul în care enzima a fost adăugată este considerat momentul zero al reacției de hidroliză. Pentru monitorizarea reacției, probe de 200 μl au fost luate la diferite momente (în timpul de 24 de ore) și cantitatea de zaharuri totale a fost determinată. Metoda colorimetrică cu 3,5-dinitrosalicilic acid (DNS) a fost utilizată pentru cuantificarea zaharurilor existente în amestecul de reacție.

În scopul de a calcula conținutul total de zahăr, ecuația de mai jos devine:

$$C_G = \frac{(E_p + 0.01317)10}{0.1384} \text{ [mg glucoză/ml]} \quad (\text{VII.8.})$$

unde factorul de diluție este 10 și E_p extinderea (absorbanta) de soluție, măsurată la λ = 540 nm.

VII.8. Studiul comparativ al influenței tipurilor de pretratare a biomasei 137

Cantitatea de zaharuri rezultată din hidroliza enzimatică a rumegușului liofilizat și pretratată în cuptorul cu microunde este prezentată în tabelele VII.20 și VII.21.

Tabelul VII 20. Rezultatele de la hidroliza enzimatică a rumegușului liofilizat cu AccelleraseTM 1000 la 40 ° C folosit ca biomasă

Timpul (min)	Tipul de biomasă		
	Câneapă(cu NaOH)	Stejar(cu NaOH)	Brad (cu NaOH)
	Glucoză liberă (μg/ mg rumeguș pretratată)		
30	9.17	6.52	4.81
60	17.58	8.71	6.83
90	26.86	11.38	7.87
120	38.44	14.22	8.90
180	64.49	18.72	11.31
240	96.79	22.50	14.55
300	117.19	28.23	15.70
360	129.12	29.14	17.19
420	148.10	34.15	18.73
600	190.0	45.90	24.17
1440	227.56	69.41	40.60

Randamentul obținut de la hidroliza enzimatică depinde de structura chimică a lignocelulozei [159,160] Datele de mai sus arată în mod clar, că prin pretratarea cu liofilizare în mediu alcalin al cânepii, au condus la obținerea unei eficiențe ridicate a hidrolizei enzimatică Conform datelor din literatura de specialitate,[161]rezultatele experimentale ar putea fi explicate prin conținutul redus de lignină din biomasa lignocelulozică, herbasee. Datele prezentate în tabelul VII.20. arată că în cazul bradului se obțin cele mai mici concentrații de zaharuri, din cauza condensării lignocelulozei [162].

Este bine cunoscut faptul că transformarea biomasei în zaharuri fermentabile și de asemenea, cantitatea de bioetanol sunt influențate de dimensiunea substratului lignocelulozic [163]. Prin urmare, diferite dimensiuni de rumeguș (măcinat și cernut) au fost supuse pretratării acide în cuptorul cu microunde și apoi hidrolizate, în scopul de a urmări influența mărimii particulelor (tabelul VII.21)[153]. De asemenea, se vor face comparații între cele două metode de pretratare.

Tabelul VII.21. Rezultatele hidrolizei enzimatică a probelor cernute (I) / măcinate (II) pretratate cu AccelleraseTM 1000, la 40 ° C

Timpul (min)	Tipul de biomasă					
	Câneapă(I)	stejar (I)	brad (I)	câneapă(II)	stejar(II)	brad(II)
	Glucoză liberă (μg/ mg rumeguș pretratată)					
30	10.89	6.22	4.33	8.0	7.80	4.52
60	15.99	7.23	6,03	9.46	7.40	4.56
90	18.83	8.18	5.25	11.73	8.48	5.25
120	21.70	8.73	5.67	12.94	9.86	5.33
180	30.48	11.04	7.33	16.88	12.71	7.57
240	43.05	18.54	8.58	20.85	17.94	8.15
300	46.06	23.06	8.15	20.98	14.60	6.76
360	61.15	19.72	12.05	17.21	19.20	11.99

420	68.47	19.45	14.46	32.71	23.60	12.10
1260	151.77	42.79	28.55	71.40	50.41	27.71
1440	149.81	42.30	30.99	63.94	62.30	32.87

Rezultatele prezentate în tabelul VII.36 arată că cele mai bune rezultate din hidroliza enzimatică au fost obținute, atunci când s-a folosit biomasa cernută, rezultată din cânepă (1,7 mm) Ținând cont de rezultatele prezentate în tabelele VII.20. și VII.21, o serie de parametri (tipul de biomasă și mărimea particulelor) și cele două metode de pretratare, au fost analizate în scopul de a stabili cele mai bune condiții de obținere a bioetanolului din biomasă.

VII.8.3. Influența metodei de pretratere a rumegușului asupra randamentului de zaharuri libere

După cum se poate observa în figura VII.26, cele mai bune rezultate în formarea zaharurilor sunt obținute prin liofilizarea în mediu alcalin a biomasei. Pretraterea acidă a probelor cernute (I) și măcinate (II) a condus la cantități mai mici de zaharuri libere. Se poate observa o creștere de patru-cinci ori a cantității de zaharuri libere (calculat ca glucoză liberă) rezultat din reacția de hidroliză enzimatică a biomasei liofilizate [153].

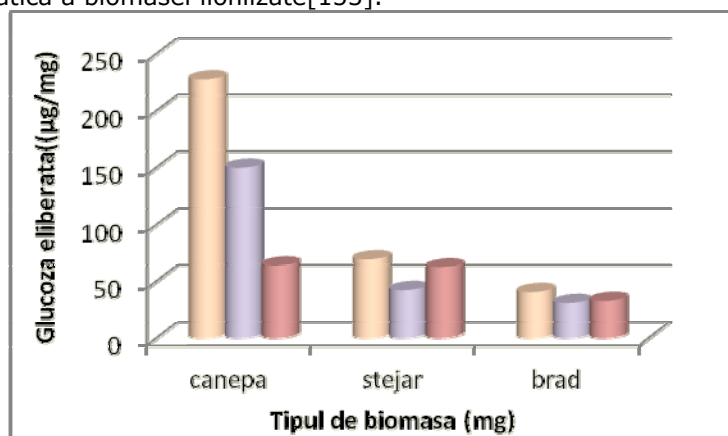


Figura VII. 26. Influența metodei de pretratere asupra hidrolizei enzimatică pe diferite tipuri de biomasă

VII.8.4. Influența mărimii particulelor de biomasă (cernut/măcinat) asupra cantității de zaharuri libere

În ceea ce privește mărimea particulelor de biomasă lignocelulozică, rezultatele prezentate în figura VII.27, arată că numai în cazul biomasei rezultate din stejar, măcinarea are o influență semnificativă asupra reacției de hidroliză enzimatică. În cazul biomasei rezultate din cânepă, cantitatea de zaharuri libere este semnificativ favorizată de utilizarea biomasei cernute decât de cea a biomasei măcinate [153].

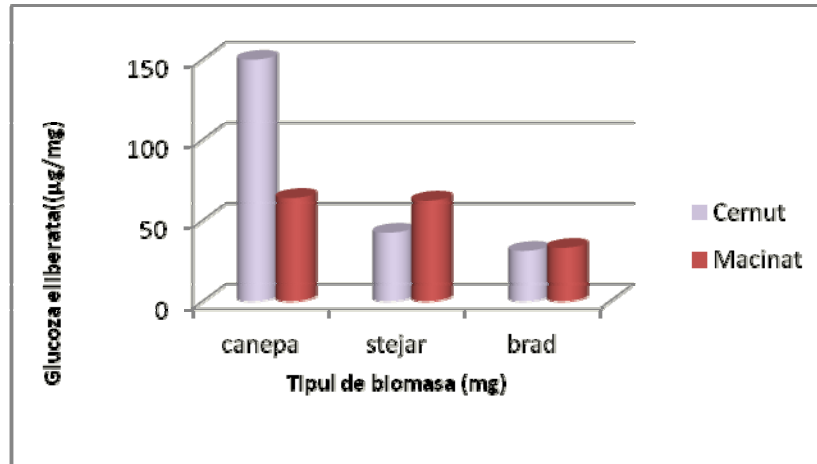


Figura VII.27. Influența dimensiunii particulelor de biomasă în reacția de hidroliză enzimatică

VII.8.5. Influența tipului de biomasă asupra cantității de zaharuri libere

După cum se poate observa în figurile. VII.28., VII.29. și VII.30, cele mai bune rezultate în urma reacției de hidroliză sunt obținute în cazul biomasei rezultate din cânepă (figura.VII.31). Pretratarea probelor, prin liofilizare, în mediu alcalin și prin metoda combinată cu pretratarea acidă în cuptorul cu microunde a biomasei, au condus la obținerea de randamente bune pentru zaharurile libere[153].

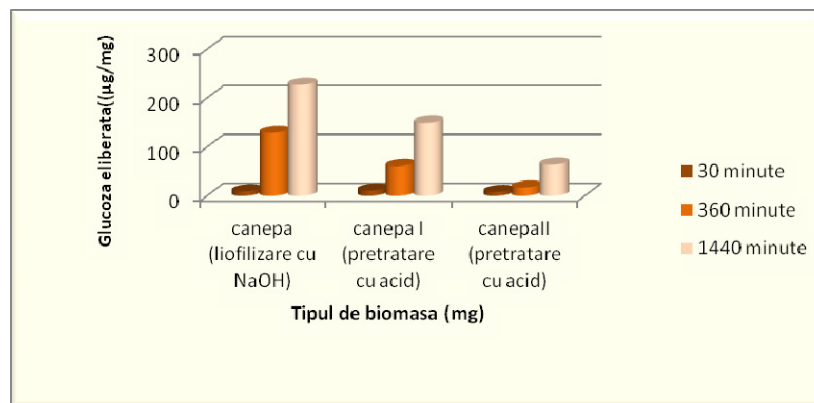


Figura. VII.28. Formarea zaharurilor din hidroliza enzimatică a probei pretratate rezultate din cânepă

În ceea ce privește rumegușul rezultat din lemn de stejar, obținut prin măcinarea scoarței (stejar II) a avut o influență benefică asupra evoluției reacției de hidroliză (fig.VII.29).

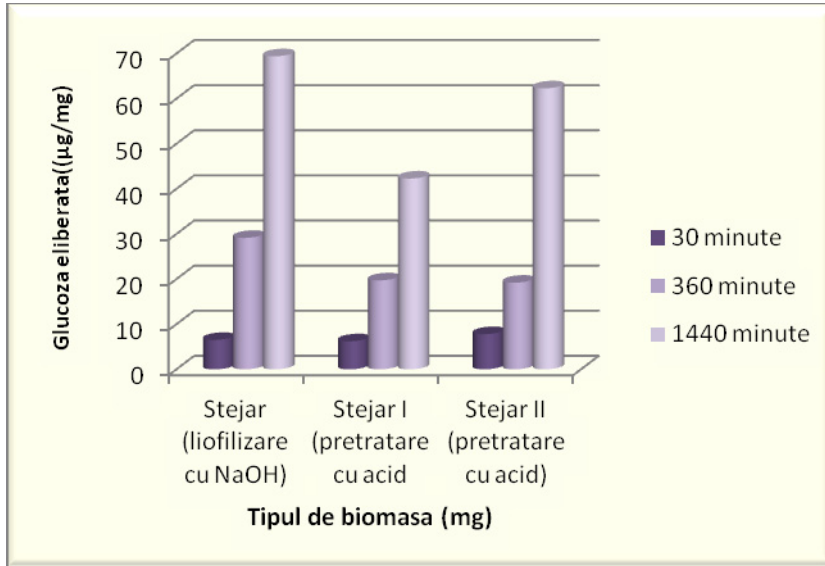


Fig.VII.29. Formarea zaharurilor din hidroliza enzimatică a probei pretratate rezultate din stejar

În schimb, în cazul rumeguşului rezultat din lemn de brad, nu există diferenţe mari între rezultatele obţinute din reacţia de hidroliză enzimatică a probei cernute(I)/ măcinate(II)(figura VII.30.)

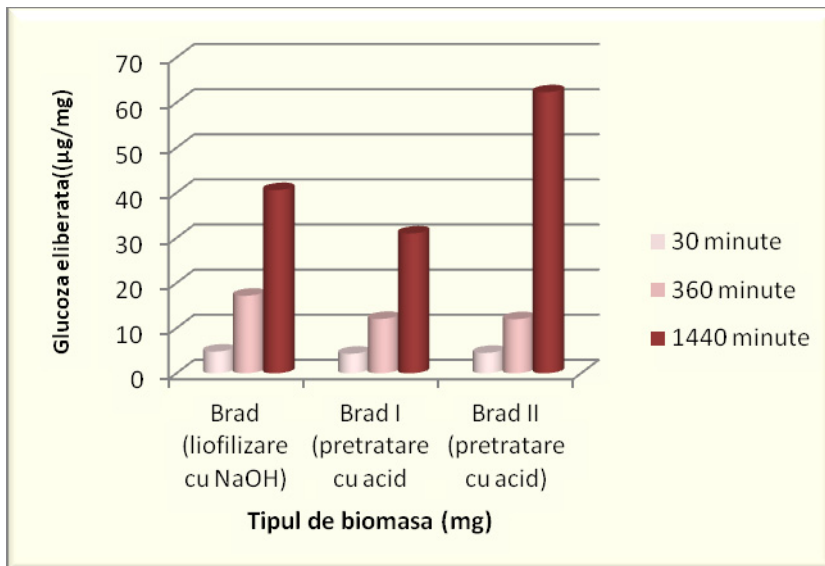


Fig.VII.30. Formarea zaharurilor din hidroliza enzimatică a probei pretratate rezultate din brad

Cele mai bune randamente pentru concentrația de zaharuri libere din reacția de hidroliză enzimatică sunt obținute atunci când se utilizează biomasa rezultată din cânepă.

Rezultatele obținute din hidroliza enzimatică pe diferite tipuri de rumeguș arată că concentrații mari de glucoză se obțin în cazul speciilor erbacee (cânepă), rumeguș din scoarță (stejar). Rezultatele sunt explicate prin nivelul de lignină și hemiceluloză din cânepă și din stejar.

Substratul biomasei pretratate conține, de asemenea lignina și alți inhibitori de celulază. Se pare că lignina nu are activitate inhibitorie[153].

Concluzii parțiale:

- Culturile de *Trichoderma reesei* au prezentat o dezvoltare mai slabă a microorganismului în condiții aerobe decât în condiții anaerobe. Celulaza nu a fost detectată după prima zi, însă s-a format în cantitate destul de mare după 48 de ore, după care a dispărut aproape total din mediu la timpul de 6 zile;
- Celulaza poate fi biosintetizată și în condiții aerobe din culturi de *Trichoderma reesei*, însă este foarte important să se cunoască timpul optim la care să se oprească cultura dacă activitatea celulozică este maximă;
- Tulpina de *Zymomonas studiată* nu este producătoare de celulază în condițiile de mediu de cultură studiate de noi;
- Microorganismul *Butyrivibrio fibrisolvens* din rumen a arătat că se poate dezvolta atât în condiții aerobe cât și anaerobe, însă în condiții aerobe a produs o cantitate mai mare de enzimă, activitatea enzimatică a fost mai mare decât cea înregistrată în culturile de *Trichoderma*;
- Rezultatele nu arată diferențe semnificative în ceea ce privește conținutul total de zaharuri netransformate, independent de concentrația inițială a celulozei. Se pare că în acest caz, concentrațiile inițiale mai mari de celuloză au influență pozitivă asupra cantităților totale de zaharuri fermentate;
- Din studiul comparativ al microorganismelor utilizate în sinteza producerii bioetanolului, se constată că aceste culturi de *Trichoderma reesei* au înregistrat o creștere mai moderată a microorganismului în condiții aerobe comparativ cu cele anaerobe. Celulaza nu a fost detectată după prima zi, însă după 48 de ore s-a remarcat prezența unei cantități suficient de mari. După șase zile a dispărut aproape complet din mediu. Celulaza poate fi biosintetizată de asemenea în condiții aerobe din culturi de *Trichoderma reesei*, dar este foarte importantă cunoașterea timpului optim pentru oprirea culturii în cazul prezenței unei activități ridicate a celulozei;
- Tulpina de *Zymomonas* prezintă o creștere mai redusă în condiții aerobe decât în cele anaerobe, dar apariția celulozei nu s-a remarcat în nici unul din cele două cazuri. Se poate evidenția că studiul tulpinii de *Zymomonas* nu poate produce celulază în mediul de cultură utilizat în experimentele noastre;
- Rezultatele studiului ilustrează că acțiunea *T. reesei* asupra celulozei a condus la obținerea zaharurilor (determinate ca glucoză) cu un randament de 45-70%. Conținuturi mai ridicate de zaharuri sunt obținute pentru o concentrație inițială a celulozei de 5-10 g/l. Concentrații de celuloză de 15-20 g/l prezintă un efect inhibitor asupra degradării celulozei;

- Valorile experimentale ale conținutului total de zahăr după acțiunea *Z. mobilis* asupra glucozei arată că doar cantități reduse de zahăr nu au fost transformate. Valori similare ale zaharurilor netransformate au fost obținute după acțiunea amestecului *T. reesei* – *Z. mobilis* asupra substraturilor celulozice. După cum rezultă din valorile prezentate în tabelul 6 și figura 6, concentrația mai ridicată de celuloză a mediului de cultură sintetic, nu prezintă consecințe negative asupra procesului de degradare a celulozei;
- În cazul studiului comparativ rezultă că pretratarea prin liofilizare în mediu alcalin a biomasei, îmbunătățește semnificativ randamentul de zaharuri libere și trebuie privită ca un element-cheie în transformarea biochimică a lignocelulozei. Comparativ cu metodele convenționale de pretratare a biomasei lignocelulozice, liofilizarea în mediu alcalin are următoarele avantaje:
 - Reduce consumul de reactivi;
 - Pretratarea se realizează într-o etapă;
 - Simplitate și eficiență
- Rezultatele arată că nu există nici o îmbunătățire semnificativă a randamentului de zaharuri libere atunci când este utilizată biomasa lignocelulozică măcinată. Prin urmare, o etapă de pretratare mecanică (cernerea) -este satisfăcătoare și astfel poate fi evitată o etapă ce consumă energie și anume, măcinarea;
- În ceea ce privește tipul de biomasă, rezultatele arată că proba obținută din cânepă dă cel mai mare randament de zaharuri libere.

CAPITOLUL VIII

Studiu economic

Studii recente au arătat că pretratamentul definește gradul și costul la care carbohidrații celulozei sau hemicelulozei pot fi convertiți la bioetanol.

S-a demonstrat că alegerea metodei de pretratare influențează în mod semnificativ eficiența și configurația ulterioară a procesului tehnologic

Etapa de pretratere este esențială pentru obținerea bioetanolului prin fermentarea biomasei, întrucât aceasta reprezintă aproximativ 30% din costul total al etanolului.

VIII.1. Obiectivele pretratării

O pretratere eficientă este caracterizată de mai multe criterii. Se evită astfel nevoia de a reduce dimensiunea particulelor de biomasă, păstrează fracțiuni de pentose (hemiceluloză), limitează formarea produșilor de degradare care inhibă creșterea de microorganisme fermentative, minimizează cererile de energie și a costurilor.

Rezultatele pretratării trebuie să fie în balanță cu impactul acestora asupra costului etapelor de prelucrare și de compromis între cheltuielile de funcționare, costurile de capital, precum și costurile de biomasă[165].

VIII.2. Analiza SWOT

Obiectivul *analizei SWOT* este de a determina cea mai potrivită metodă de pretratere a materialului lignocelulozic.

În ceea ce **privesc punctele forte**, acestea sunt legate de:

- diminuarea efectelor negative asupra mediului (reducerea emisiilor de gaze),
- utilizarea biomasei lignocelulozice ce reprezintă o sursă abundentă și ieftină,
- utilizarea biocombustibililor nu necesită schimbări majore la autovehicule.

În ceea ce **privesc punctele slabe** cele mai importante se referă la:

- lipsa unei strategii unitare de utilizare a energiilor regenerabile în vederea înlocuirii surselor clasice;
- lipsa unor programe locale și regionale de management energetic,
- promovare a resurselor regenerabile;
- lipsa centrelor de diseminare a informației privind resursele.

În elaborarea strategiilor pentru biocombustibili este necesar să se țină seama însă și de **amenințări și oportunități**. Ca amenințări, mai importante se consideră: incertitudini pe termen lung privind cererea și prețul ofertei, atât pentru biomasă cât și pentru biocombustibili; dezvoltarea unor opțiuni potențial concurente pentru transport (vehicule electrice, cele propulsate cu hidrogen etc)[165].

VIII.3. Factorii dezvoltării producției de biocombustibil și piața biocombustibililor

Factorii dezvoltării în viitor a producțiilor de biocombustibili pot fi considerați următorii: prețul petrolului, efectul biocombustibililor asupra reducerii emisiilor poluante, disponibilul de materie primă și costul acesteia, costul biocombustibililor, politicile guvernamentale, eficiența conversiei biomasei, perfecționarea tehnologiilor, impulsivitatea cercetării pentru tehnologiile generațiilor următoare de biocombustibili, opțiunile pentru export, modul de funcționare a pieței carburanților cu toți jucătorii acesteia.

Piața combustibililor cuprinde ca orice piață oferta și cererea, fiecare dintre ele fiind determinate de factori interni și factori externi. Oferta ca factori interni este influențată de disponibilul de biomasă, nivelul investițiilor în întreprinderi, existența economiilor de scală, iar ca factori externi: nivelul cotelor de biocombustibili, politica fiscală și posibilitățile de export.

VIII.4. Aspecte economice în ceea ce privește producția de bioetanol din biomasă lignocelulozică

În prezent, există puține mijloace de eficientizare a proceselor tehnologice de obținere a bioetanolului (ceea ce ar duce la micșorarea prețului de cost al acestuia), tehnologia de fermentare fiind una pe deplin definită.

Costurile aferente producerii etanolului pot fi estimate, datorită unei mari varietăți de materie primă, tipul tehnologiei de producere și practicile din agricultură, fiind determinate în mare măsură de costul materiei prime, care poate constitui până la 50-80% din costul final.

În cazul tehnologiilor de producere a bioetanolului din biomasa celulozică, trebuie luate în considerare și cheltuielile legate de achiziționarea enzimelor necesare în procesele de hidroliză. Cu toate acestea, costurile reale sunt estimate pentru că există o stransă dependență de tipul materiei prime utilizate.

Analiza cost-beneficiu este o metodă de evaluare a unei politici care cuantifică în bani, valoarea tuturor consecințelor sale asupra membrilor societății. Beneficiul net social exprimă valoarea acestei politici.

Diferența dintre prestațiile sociale (B), precum și costurile sociale (C) reprezintă beneficiile sociale nete (BSN).

Scopul principal al analizei cost-beneficiu (ACB) este de a ajuta factorii de decizie politică pentru a asigura o distribuire echitabilă a resurselor.

Există două tipuri de CBA: ex-ante și ex-post. Analiza ex-ante se face înainte ca un proiect sau o măsură politică să aiba loc.

Analiza ex-post se face la sfârșitul perioadei de implementare a proiectului sau a măsurii politice. Valoarea analizelor ex-post este cu atât mai mare cu cât informațiile furnizate creează un cadru de învățare pentru factorii de decizie sau pentru cei care dezvoltă proiecte [165,166].

În această secțiune, partea financiară a CBA este prezentată, în conformitate cu articolul 40 alineatul (e) din Reg. 1083/2006, care impune statelor membre (sau de autoritatea de gestionare). Calculele sunt făcute în funcție de analiza necesară pentru finanțarea proiectului european. Astfel, în această secțiune aspectele economice ale producerii de bioetanol sunt abordate din punct de vedere al finanțării europene [167].

VIII.4.Aspecte economice în ceea ce privește producția de bioetanol 145

În acest studiu de caz, costurile de investiții se referă la achiziționarea echipamentului necesar:

- rezervor inox pregătire pretratare: 250 litri de 1500 €.
- amestecător palete de 500 €.
- pompa dozatoare de 500 €.
- rezervor hidroliză enzimatică de 1800 €.
- fermentator de 2200 €.
- distilator de 2000 €.
- răcitor de 1500 €.

Consumul de energie electrică este dat de:

- amestecător 2kw/h * 24 ore = 48 kw
- pompă dozatoare 1,5 kw/h * 8 ore = 12 kw
- centrală încălzire 26 kw
- distilatorul 8 kw * 36 ore = 288 kw
- personal 1 om / luna

Costurile de investiții sunt efectuate pentru a produce bioetanol, pentru o capacitate de 100 kg de biomasă. Acestea sunt la o valoare monetară de 10000 €. Cu toate acestea, complexitatea proiectului necesită investiții suplimentare mari. Această investiție se va face numai o singură dată[165,168] .

Costurile de operare apar în exploatarea unei investiții, inclusiv costurile curente de exploatare și cele de mentenanță, dar excluzând deprecierea sau pierderea de capital. Aici, numai fluxurile de numerar sunt luate în considerare, deprecierea non-numerar nefiind inclusă în această categorie[168].

Tabelul VIII.1. Costurile totale de investiție, costurile de operare și venituri

Nr.	Buget (Euro)	Anul				
		1	2	3	4	5
1	Echipament	-10000.0	-	-	-	-
2	Total active imobilizate	-10000.0	-	-	-	-
3	Costurile totale de investiții	-10000.0	-	-	-	
4	Materii prime	-2682.4	-2462.1	-2462.1	-2462.1	-2462.1
5	Salarii	-1500.0	-1500.0	-1500.0	-1500.0	-1500.0
6	Energie electrică	-187.7	-187.7	-187.7	-187.7	-187.7
7	Întreținere	0.0	-200.0	-200.0	-200.0	-200.0
8	Costuri administrative	-200.0	-200.0	-200.0	-200.0	-200.0
9	Costurile totale de operare	-4570.0	-4550.0	-4550.0	-4550.0	-4550.0
10	Ieșire - Bioetanol	6563.7	6563.7	6563.7	6563.7	6563.7
11	Total venituri din exploatare	6563.7	6563.7	6563.7	6563.7	6563.7
12	Veniturile nete din exploatare (9 11)	1993.7	2013.7	2013.7	2013.7	2013.7

Rata de indicatori financiari, valoarea netă financiară (VFNA) și rata de rentabilitate financiară (FRR), sunt calculate într-un mod echilibrat pentru o perioadă de 5 ani.

Tabelul VIII.2. Indicatorii financiari

Nr.	Buget (Euro)	Anul				
		1	2	3	4	5
1	Total venituri exploatare	6563.7	6563.7	6563.7	6563.7	6563.7
2	total intrări	6563.7	6563.7	6563.7	6563.7	6563.7
3	Costurile totale de operare	-4570.0	-4550.0	-4550.0	-4550.0	-4550.0
4	Costurile totale de investiții	-10000.0	-	-	-	
5	Total ieșiri	-14570.	-4550.0	-4550.0	-4550.0	450.0
6	Fluxul de numerar net (2 +5)	-8006.00	2014.0	2014.0	2014.0	7014.0
7	Rata de rentabilitate financiară a investiției - FRR (C)	17.9%				
8	Rata Discount pentru FNPV(C)	5.0%				
9	Valoarea netă financiară actuală a investiției - FNP(C)	3093.5				

VIII.5. Avantaje ale valorificării deșeurilor lemnoase

Avantaje ale valorificării deșeurilor lemnoase sunt:

- valorificarea produsului rezultat prin comercializarea sa, atât pe piața internă cât și la export;
- aplicarea standardelor de calitate și de mediu existente la nivel European;
- asigurarea unei protecții ecologice eficiente a populației, precum și a apei, a pădurii, etc.
- reciclarea materialelor;
- eliminarea deșeurilor de material lemnos de pe suprafețele de depozitare;
- asigurarea unor performanțe de ardere superioare a produselor peletizate, sub aspectul duratei mai mari de ardere a aceluiași volum de material, precum și a unei cantități de căldură recuperate, mai mari;
- utilizarea eficientă a deșeurilor de material lemnos, rezultate prin prelucrarea lemnului;

Concluzii parțiale:

- Costul producției de bioetanol depinde foarte mult de compoziția biomasei și de tipul etapelor, inclusiv pregătirea substratului și reducerea dimensiunilor acestuia, hidroliza hemicelulozei, detoxificarea mediului, fermentarea zaharidelor provenite din hemiceluloză, producerea celulozelor, distilarea și tratarea reziduurilor.
- Pentru managementul deșeurilor industriale biodegradabile, abordarea trebuie să se facă la nivel global cu integrarea intereselor mai multor actori sociali și economici.

CAPITOLUL IX

Concluzii finale

- Cercetările abordate în teză au vizat în special pretratarea biomasei, întrucât această etapă este absolut esențială pentru obținerea bioetanolului reprezentând aproximativ 30% din costul total al etanolului.
- **Gradul de nouitate** al acestui studiu se referă la un procedeu de pretratare a substratului lignocelulozic pentru a facilita biodegradarea enzimatică a lignocelulozei. Acesta se caracterizează prin simplitate și eficiență, reducerea timpului de reacție, utilizarea unor reactivi chimici ieftini și se evită degradarea monozaharidelor și formarea produșilor intermediari furani și fenoli compuși ce inhibă procesul de fermentare, diminuând în acest fel randamentul etanolului.
- **Obiectivul** acestui studiu este eficientizarea procesului de solubilizare totală sau parțială a celulozei și hemicelulozei din trei tipuri diferite de biomasă: lemn esență tare, moale și biomasă de tip ierbos, prin designul, dezvoltarea unor procedee inovative de pretratare.
- Un alt obiectiv este studiul proceselor de pretratare a biomasei lignocelulozice prin diminuarea timpului de reacție și utilizarea unor cantități mai mici de reactivi astfel se elimină formarea compușilor nedoriți, care afectează randamentul de obținere a bioetanolului.
- În etapa de fractionare (pretratare) are loc solubilizarea totală sau parțială a ligninei și hemicelulozei.
- **Scopul** acestei etape este de a distruge sau îndepărta piedicile structurale și de compoziție ce pot fi implicate în procesul de hidroliză, precum și de a îmbunătăți viteza de hidroliză a enzimelor și de a mări randamentul de obținere a zaharurilor fermentabile din celuloză sau hemiceluloză.
- Pretratamentul alterează structura celulozică a biomasei pentru a facilita accesul enzimei la conversia carbohidraților polimeri în zaharuri fermentabile, și de a facilita producția de microorganisme de către celulază.
- O pretratare eficientă este caracterizată de mai multe criterii. Se evită astfel nevoia de a reduce dimensiunea particulelor de biomasă, păstrează fracțiuni de pentose (hemiceluloză), limitează formarea produsilor de degradare care inhibă creșterea de microorganisme fermentative, minimizează cererile de energie și a costurilor.
- **Umiditatea** este o proprietate a biomasei foarte importantă de care depinde proiectarea instalației și desfășurarea întregului proces de obținere a bioetanolului. Procentul de umiditate nu trebuie să depășească 40% din masă.
- Cu cât umiditatea este mai mare cu atât puterea calorică este mai mică.
- Umiditatea cea mai ridicată se întâlnește la biomasa de plop, urmat de cel de salcâm, iar biomasa de brad prezintă umiditatea cea mai scăzută.
- **Prin spectroscopie de FT-IR** s-a pus în evidență prezența constituenților lignocelulozei (celuloză, hemiceluloză și lignoceluloză).
- În spectrul IR al probelor de biomasă lignocelulozică se pot observa un număr mare de picuri, care pot fi atribuite vibrațiilor de valență și de deformație caracteristice principalilor componenți ale lignocelulozei: monozaharide și lignină.

- **Din analiza cantitativă prin microscopie de baleiaj** se poate observa că topografia suprafeței pentru biomasa lignocelulozică netratată este nemodificată în comparație cu probele tratate prin ultrasonare. Efectul pretratării diferă la cele patru probe de biomasă lignocelulozică astfel, constatându-se că distrugerea și fragmentarea cea mai vizibilă este în cazul bradului.
- Din analiza elementară pe suprafață se constată că aceste concentrații procentuale de masă ale carbonului și oxigenului, în cazul probelor supuse pretratării sunt mai ridicate decât în cazul probelor netratate. Acest fapt se datorează fragmentării legăturilor dintre principalii constituenți majoritari: celuloza, lignina și hemiceluloza.
- Doar în cazul probelor de lignoceluloză de tip ierbos (cânepa) prin prelucrarea probelor are loc o modificare a conținutului de minerale: o scădere de Mg, P, Cu și S, și o creștere de Al după etapa de pretratare prin scindarea fizico-chimică (ultrasonare).
- Morfologia și compoziția elementară a biomasei lignocelulozice diferă la cele patru probe de biomasă lignocelulozică.
- Concentrația As din probele analizate se află sub limita de detecție a aparatului.
- În substratul de adsorbție prezența metalelor grele este nedorită, eliberarea lor fiind posibilă și lentă în timp.
- Cea mai mare cantitate de lignină insolubilă în acid se găsește în rumegușul de brad, iar cea mai mică în rumegușul de plop.
- Cea mai mare cantitate de lignină solubilă în acid corespunzătoare filtratului (hidrolizat) s-a obținut în cazul rumegușului de salcâm, iar cea mai mică în cazul rumegușului de brad.
- Cea mai mare cantitate de solide totale, și deci cea mai mică cantitate de umiditate, corespunzătoare tipurilor de biomasă supuse analizei s-a obținut în cazul rumegușului de brad.
- **Pretratarea combinată cu acid și microunde**, permite pretratarea substratului lignocelulozic într-o singură etapă, la o temperatură de peste 100°C și într-un interval de timp de până la 30 minute, cu randamente de până la 50%.
- Folosind metoda pretratării biomasei celulozice cu ajutorul microundelor, cantitatea de zaharuri obținute direct în urma hidrolizei care are loc în timpul pretratamentului a fost mai mare în cazul rumegușului cernut prin site, decât a celui măcinat, deci un grad de mărunțire mai avansat duce la creșterea eficienței pretratamentului.
- Prin creșterea temperaturii de pretratare a crescut cantitatea de zaharuri obținută.
- O durată mai mare de pretratament a determinat în general obținerea în soluțiile rezultate a unei cantități mai ridicate de zaharuri, însă aceasta depinde de temperatură.
- Prin pretratarea combinată cu acid și microunde a biomasei se evită degradarea monozaharidelor și formarea produșilor intermediari furani și fenoli compuși ce inhibă procesul de fermentare, diminuând în acest fel randamentul etanolului. Formarea acestor inhibitori este favorizată de hidroliza care are loc la temperaturi ridicate și acizi concentrați care inhibă fermentarea.
- Aceasta metoda prezintă următoarele *avantaje*:
 - ~ simplitate și eficiență;
 - ~ reducerea timpului de reacție;
 - ~ se folosesc exclusiv reactivi chimici ieftini.

- **Pretratarea** biomasei lignocelulozice **prin liofilizare** la un procedeu de fractionare a lignocelulozei în bipolimerii constituenți pentru a facilita atacul enzimatic, în mediu slab acid sau bazic, la temperatură și presiune scăzută.
- Comparativ cu metodele chimice tradiționale de pretratare, procedeu de fracționare a lignocelulozei are următoarele avantaje:
 - ~ utilizarea exclusivă a unor reactivi ieftini;
 - ~ reducerea consumului de reactivi;
 - ~ desfășurarea procesului într-o singură etapă;
 - ~ randament ridicat de obținere a monozaharidelor (pentoze și hexoze) din lignoceluloză;
 - ~ cost redus;
 - ~ nu necesită recuperarea acidului;
 - ~ simplitate și eficiență;
- În cazul studiului comparativ rezultă că pretratarea prin liofilizarea în mediu alcalin a biomasei îmbunătățește semnificativ randamentul de zaharuri libere și trebuie privită ca un element-cheie în transformarea biochimică a lignocelulozei.
- Procesul de pretratare a biomasei lignocelulozice prin liofilizare este caracterizat prin eficiență și ingeniozitate datorită faptului că biomasa pretratată asigură creșterea randamentului hidrolizei enzimatice și în același timp permite fracționarea cu randamente comparabile a tuturor tipurilor de biomasă comparativ cu procedeele de pretratare tradiționale.
- **Pretratarea** biomasei lignocelulozice **prin ultrasonare** în apă, a fost efectuată pentru a urmări influența etapei de pretratare asupra probelor în ceea ce privește structura de suprafață și compoziția elementară a biomasei, cât și pentru a evidenția procesul de hidroliză.
- Etapa tradițională de hidroliză chimică a celulozei din diferite tipuri de biomasă lignocelulozice are loc printr-un atac cu acid diluat sau concentrat.
- Hidroliza cu acid diluat se desfășoară la temperaturi și presiuni ridicate, iar timpul necesar desfășurării reacției este de ordinul secundelor sau minutelor, însă permite formarea unor produși secundari, toxici pentru microorganismele fermentative, determinând în acest fel o scădere a randamentului și implicit a productivității, precum și împiedicarea dezvoltării celulare.
- În etapa de fermentare are loc biotransformarea diferitelor surse de biomasă lignocelulozică în bioetanol, sub acțiunea diferitelor tipuri de microorganisme (bacterii, ciuperci), care pot fermenta carbohidrați în condiții anaerobe. Randamentul de obținere a bioetanolului lignocelulozic este direct influențat de eficiența etapei de fermentare a zaharidelor din biomasa lignocelulozică.
- Utilizarea unor microorganisme fermentative capabile să acționeze concomitent atât asupra hexozelor cât și pentozelor existente în hidrolizatului provenit din materialele lignocelulozice este determinată pentru creșterea competitivității economice a etanolului celulozic.
- **Culturile de *Trichoderma reesei*** au prezentat o dezvoltare mai slabă a microorganismului în condiții aerobe decât în condiții anaerobe. Celulaza nu a fost detectată după prima zi, însă s-a format în cantitate destul de mare după 48 de ore, după care a dispărut aproape total din mediu la timpul de 6 zile.
- Celulaza poate fi biosintetizată și în condiții aerobe din culturi de *Trichoderma reesei*, însă este foarte important să se cunoască timpul optim la care să se oprească cultura, dacă activitatea celulozică este maximă.
- Acest microorganism poate sintetiza celulază atât în condiții anaerobe cât și aerobe, prezintă importanță în perspectiva realizării unor culturi mixte cu alte

microorganismele, ceea ce necesită o flexibilitate pronunțată în ce privește conținutul de oxigen al mediului

- **Tulpina de *Zymomonas*** prezintă o creștere mai redusă în condiții aerobe decât în cele anaerobe dar apariția celulozei nu s-a remarcat în nici unul din cele două cazuri. Se poate evidenția că studiul tulpinii de *Zymomonas* nu poate produce celuloză în mediul de cultură utilizat.
- **Microorganismul *Butyrivibrio fibrisolvens* din rumen** a arătat că se poate dezvolta atât în condiții aerobe cât și anaerobe, însă în condiții aerobe a produs o cantitate mai mare de enzimă, activitatea enzimatică a fost mai mare decât cea înregistrată în culturile de *Trichoderma*.
- **Microorganismul *Butyrivibrio fibrisolvens* din rumen reprezintă gradul de nouitate în etapa de hidroliză enzimatică a biomasei lignocelulozice.**
- Acest microorganism s-a comportat în mod asemănător ca *Trichoderma*, în sensul că a produs cea mai mare cantitate de celuloză după 48 de ore și apoi activitatea celulozică s-a redus foarte mult.
- Cantitatea de proteină a înregistrat o creștere constantă pe întreaga durată a celor 6 zile de cultură, ceea ce arată că mediul de cultură utilizat a fost adecvat din punct de vedere al asigurării factorilor nutritivi necesari.
- Este important ca activitatea enzimatică să fie monitorizată permanent și cultura să fie oprită atunci când ea a ajuns la valoarea maximă, înainte de a începe degradarea celulozei.
- Valorile activității celulozice sunt bune, fiind necesară optimizarea în continuare a condițiilor de cultură pentru a obține activitatea celulozică maximă posibilă.
- Microorganismele din rumen cele mai bune producătoare de celuloze.
- Din **studiul comparativ al microorganismelor** utilizate în sinteza producerii bioetanolului, se constată că aceste culturi de *Trichoderma reesei* au înregistrat o creștere mai moderată a microorganismului în condiții aerobe comparativ cu cele anaerobe.
- Tulpina de *Zymomonas* prezintă o creștere mai redusă în condiții aerobe decât în cele anaerobe.
- Rezultatele studiului ilustrează că acțiunea *T. reesei* asupra celulozei a condus la obținerea zaharurilor (determinate ca glucoză) cu un randament de 45-70%. Conținuturi mai ridicate de zaharuri sunt obținute pentru o concentrație inițială a celulozei de 5-10 g/L. Concentrații de celuloză de 15-20 g/L prezintă un efect inhibitor asupra degradării celulozei.
- Valorile experimentale ale conținutului total de zahar după acțiunea *Z. mobilis* asupra glucozei arată că, doar cantități reduse de zahar nu au fost transformate.
- Valori similare ale zaharurilor netransformate au fost obținute după acțiunea amestecului *T. reesei* – *Z. mobilis* asupra substraturilor celulozice **ce reprezintă gradul de nouitate datorită faptului că pentru prima dată s-a utilizat un astfel de consorțiu de microorganisme.**
- Pentru a demonstra **influența naturii substrat și raport enzimă:substrat**, s-au studiat diferite tipuri de biomasă lignocelulozică ce au fost pretratate cu acid sulfuric 0,82%, sub acțiunea microundelor.
- Prin creșterea raportului enzimă/substrat se obține și o creștere a vitezei de reacție.
- În condițiile în care prețul enzimei este ridicat, va fi necesară o optimizare a raportului enzimă/substrat pentru a avea performanțele maxime, la un preț de cost acceptabil.
- Eficiența enzimei față de biomasa pretrată este considerabil mai mică decât față de celuloza pură (Avicel), ceea ce se explică pe de o parte prin faptul că

Avicelul a avut o granulație foarte fină în timp ce biomasa a fost mărunțită doar grosier, iar pe de altă parte substratul de biomasă pretratat mai conține lignină și alți compuși inhibitori ai acțiunii celulozice.

- **Influența temperaturii** - în cazul enzimei Accelerase 1000, pentru proba de plop diferența dintre valorile obținute la cele două temperaturi este mică, deci putem considera că în acest interval, nu temperatura este factorul cel mai important care influențează reacția.
- La biomasa lignocelulozică de brad pretratat, care se hidrolizează mai greu, influența temperaturii este mai pronunțată și gradul de conversie a biomasei la zaharuri reducătoare este de aproape doua ori mai mare după șapte ore, la temperatura de 60°C.
- Există o serie de alți factori mai greu cuantificabili, așa cum este cristalinitatea celulozei, care pot avea influență decisivă, împiedicând ca viteza să crească odată cu creșterea temperaturii, așa cum se întâmplă în general la reacțiile enzimaticе.
- Dacă s-a utilizat enzima Celluclast 1.5L, cantitatea de glucoză eliberată deci și gradul de conversie cresc atât în cazul hidrolizei probei de plop pretratat cât și în cazul celui de brad.
- **Influența pH-ului** - activitatea celulozelor este mai mare la pH 4,8 pentru ambele substraturi (salcâm și brad), deși diferențele nu sunt mari, în special în cazul probei de brad de unde se poate trage concluzia că nu este necesar un control riguros al pH-ului în timpul procesului de hidroliză, eficiența catalitică a enzimelor fiind ridicată în tot intervalul de pH 4,8-6.
- **Hidroliza enzimatică** a fost efectuată asupra biomasei lignocelulozice pretratate prin liofilizare cât și prin microunde.
- Prin adaosul de BSA la hidroliză enzimatică a biomasei utilizate s-a obținut o creștere a cantității de glucoză eliberată de aproximativ 2 ori în cazul probei de cânepă și de 1,2 ori pentru cel din stejar.
- **Studiul comparativ asupra eficienței tipurilor de pretratare a biomasei lignocelulozice** a fost efectuat în scopul de a îmbunătăți eficiența hidrolizei enzimaticе a biomasei lignocelulozice.
- Liofilizarea în mediu alcalin a biomasei îmbunătățește semnificativ randamentul de zaharuri libere și trebuie privită ca un element-cheie în transformarea biochimică a lignocelulozei.
- Pretratarea acidă a rumegușului cernut(I) și măcinat (II) a condus la cantități mai mici de zaharuri libere.
- **Mărimea particulelor** are o influență semnificativă asupra reacției de hidroliză enzimatică. În cazul biomasei rezultate din cânepă, cantitatea de zaharuri libere este semnificativ favorizată de utilizarea biomasei cernute decât de cea a biomasei măcinate.
- Cele mai bune randamente pentru concentrația de zaharuri libere din reacția de hidroliză enzimatică sunt obținute atunci când se utilizează biomasa rezultată din cânepă.
- Rezultatele obținute din hidroliza enzimatică pe diferite tipuri de biomasă arată că concentrații mari de glucoză se obțin în cazul speciilor erbacee (cânepă), biomasa din scoarță (stejar). Rezultatele sunt explicate prin nivelul de lignină și hemiceluloză din cânepă și din stejar.
- În urma studiului comparativ asupra eficienței tipurilor de pretratare s-a constatat că cele două metode utilizate prezintă numeroase avantaje comparative cu cele tradiționale. Acestea se caracterizează prin:
 - ~ diminuarea timpului de reacție;

- ~ utilizarea unor cantități mai mici de reactivi;
- ~ se elimină formarea compușilor nedorți, care afectează randamentul de obținere a bioetanolului;
- ~ randamente superioare în monozaharide fermentabile;
- ~ elimină necesitatea utilizării de echipamente speciale, anticorozive;
- ~ ca materie primă se pot folosi mai multe tipuri de materiale lignocelulozice: biomasă ierboasă, lemn esență moale, lemn esență tare, în aceleași condiții de reacție (cantitate de reactivi, timp de reacție, temperatură, presiune).
- Costul producției de bioetanol depinde foarte mult de compoziția biomasei și de tipul etapelor, inclusiv pregătirea substratului și reducerea dimensiunilor acestuia, hidroliza hemicelulozei, detoxificarea mediului, fermentarea zaharidelor provenite din hemiceluloză, producerea celulezelor, distilarea și tratarea reziduurilor.
- Rezultatele pretratării trebuie să fie în balanță cu impactul acestora asupra costului etapelor de prelucrare și de compromis între cheltuielile de funcționare, costurile de capital, precum și costurile de biomasă.
- Prin atingerea obiectivelor acest studiu prezintă următoarele avantaje:
 - ~ valorificarea superioară a deșeurilor lignocelulozice;
 - ~ protejarea resurselor alimentare;
 - ~ reducerea impactului asupra mediului prin protejarea biodiversității;
 - ~ bioetanolul obținut reduce emisiile de dioxid de carbon cu aproximativ 50% față de combustibilii obținuți din țiței;
 - ~ respectarea directivei CE 30/2003.

BIBLIOGRAFIE

- [1] Arion V., Bordeianu C., Boscaneanu A., Capcelea A., Drucioc S., Gherman C. *Biomasa si utilizarea ei in scopuri energetic*, Editura Garomond-Studio Ltd **2008**;
- [2] Maties M.I., Balcu I., Segneanu A.E., **Macarie C.**, Mirica M.C., Fitigau F. *"Bioetanol"*, Editura "Mirton" **2011**;
- [3] Biocarburanții în România, SC Chiminform Data SA, București, p 1-41, **2004**;
- [4] Driving without petroleum? A Comparative Guide to Biofuels, Gas-to-Liquids and Coal-to-Liquids as Fuels for Transportation, Energy Charter Secretariat , pp 79 May **2007**;
- [5] Saxena R.C., Adhikari D.K., Goyal H.B., *Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review*, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 13, 167-178, **2009**;
- [6] Palonen H., *Role of lignin in enzymatic hydrolysis of lignocellulose*, VTT Technical Research, Espoo, p 11-22, p 26-32, **2004**;
- [7] Hamelinck C. N., van Hooijdonk G., A. Faaij P.C., *Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term*, Biomass and Bioenergy, 28, 384-410, **2005**;
- [8] Stephan H., *Wood-based ethanol advances on international front - Cellulosic fuel from trees gets a closer look*, Industrial Biotechnology, 2, 101-107, **2006**;
- [9] Gray K.A, Zhao L., Emptage M., *Bioethanol*, Current Opinion in Chemical Biology, 10, 141-146, **2006**;
- [10] Foody B., Tolan J.S., Bernstein J.D., Foody Sr.P., *Pretreatment process for conversion of cellulose to fuel ethanol*, US Patent Issued on July 18, **2000**;
- [11] Adam J., *Catalytic conversion of biomass to produce higher quality liquid bio-fuels*, PhD thesis, NTNU, **2005**;
- [12] Juhász T., Szengyel Z., Réczey K., Siika-Aho M., Viikari, L., *Characterization of cellulases and hemicellulases produced by Trichoderma reesei on various carbon sources*, Process Biochemistry, 40, 3519-3525, **2005**;
- [13] Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I., Oliva J. M., Cabañas A., Ballesteros M., *Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 105, 87-100, **2003**;
- [14] Lee W.G., Lee J.S., Shin C.S., Park S.C., Chang N.H., Chang Y.K., *Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 77-79, 547-559, **1999**;
- [15] Kristensen J. B., Börjesson J., Bruun M. H., Tjerneld F., Jorgensen, H., *Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose*, Enzyme and Microbial Technology, 40, 888-895, **2007**;
- [16] Demirbaş A., *Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass*, Energy Sources, 27, 327-337, **2005**;
- [17] Öhgren K., Vehmaanperä J., Siika-Aho M., Galbe M., Viikari L, Zacchi G., *High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production*, Enzyme and Microbial Technology, 40, 607-613, **2006**;
- [18] Lynd L.R., *Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, Economics, the Env-ironment, and Policy*, Annu. Rev. Energy Environ., 21, 403-465, **1996**;

- [19] Thomsen A. B., Medina C., Ahring B.K., *Biotechnology in ethanol production*, Riso Energy Report 2, 40-44, **2004**;
- [20] Purwadi R. , Brandberg T, Taherzadeh M. J., *A possible industrial solution to ferment lignocelluloyis hydrolyzate to ethanol: Continuous cultivation with flocculating*, Int. J. Mol. Sci., 8, 920-932, **2007**;
- [21] Wyman C.E., *Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges*, Annu. Rev. Energy Environ., 24, 189-226, **1999**;
- [22] Tobias M., Gunnar L., Taherzadeh M.J., *Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehydedehydrogenase and pyruvate dehydrogenase*, Biochem. J., 363, 769-776, **2002**;
- [23] Sedlak M., HO N. W. Y., *Production of Ethanol from Cellulosic Biomass Hydrolysates Using Genetically Engineered Saccharomyces Yeast Capable of Cof fermenting Glucose and Xylose*, *Biochemistry and Biotechnology*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 114, 403-416, **2004**;
- [24] Pereira R.L., *The Chemistry Involved in the Steam Treatment of Lignocellulosic Materials*, Quim. Nova, 26, 863-871, **2003**;
- [25] Badger P.C., *Ethanol from cellulose: A general review*, Trends in new crops and new uses, 17-21, **2002**;
- [26] Vessia Ø., *Biofuels from lignocellulosic material - In the Norwegian context 2010 - Technology, Potential and Costs*, NTNU, 10-23, 27-42, **2005**;
- [27] Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Holtzapple YYLM, Ladisch M., *Bioresource Technology* **2005**, 96, 673-86;
- [28] Patel SJ, Onkarappa R, Ks S., *Electron J Environ Agricultural Food Chemistry*, 6, 1921-6, **2007**;
- [29] Silverstein R.A., Master's Thesis (adv: R. Sharma), *Biological and Agricultural Engineering*, North Carolina State University, **2004**;
- [30] Chandel A.K., Es C., Rudravaram R, Narasu M.L., Rao L.V., Ravindra P., *Biotechnology Molecular Biology Rev*, 2, 14-32, **2007**;
- [31] Bourbigou O.H., Magna L., Morvan D., *Applied Catalysis A: General*, 373, 1-56, **2010**;
- [32] Laus G., Bentivoglio G., Schottenberger H., Kahlenberg V., Kopacka H., Röer T., Sixta H., *Lenzinger Berichte*, 84, 71-85, **2005**;
- [33] Dadi A.P., Varanasi S., Schall C.A., . *Biotechnol. Bioeng.*, 95, 904-910, **2006**;
- [34] Remsing R.C., Hernandez G., Swatloski R.P., Masefski W.W., Rogers R.D., Moyna G., *J. Phys. Chem. B* , 112, 11071-11078, **2008**;
- [35] Swatloski R.P., Spear S.K., Holbrey J.D., Rogers R.D., *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 4974-4975, **2002**;
- [36] Zhao H., Baker G.A., Song Z., Olubajo O., Crittle T., Peters D., *Green Chem .*, 10, 696-705, **2008**;
- [37] Kamiya N., Matsushita Y., Hanaki M., Nakashima K., Narita M., Goto M., Takahashi H., *Biotechnol. Lett*, 30, 1037-1040, **2008**;
- [38] Kilpelainen I., Xie H., King A., Granstrom M., Heikkinen S., Argyropoulos D.S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (22), 9142-9148, **2007**;
- [39] Dadi A.P., Schall C.A., Varanasi S., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137, 407-421, **2007**;
- [40] Zavrel M., Bross D., Funke M., Büchs J., Spiess A. C., *Bioresource Technology*, 100, 2580-2587, **2009**;
- [41] Kilpelainen I., Xie H., King A., Granstrom M., Heikkinen S., Argyropoulos D.S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (22), 9142-9148, **2007**;
- [42] Yu-Cai Q. L. He., Xian M., Jun G., Xu X., Yang J.M., Li L.Z., *Bioresource Technology*, 100, 3570-3575, **2009**;

- [43] Mabee W. E., Gregg D. J., Arato C., Berlin A., Bura R., Gilkes N., Mirochnik O., Pan X., Kendall Pye E., Saddler J. N., *Updates on Softwood-to-Ethanol Process Development*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 129, 55-70, **2006**;
- [44] Rajiv R., Stefan T., Gounaris C. E., Woo M., Floudas C.A., Von K.M., Valentas K. J., Wei J., Tsapatsis M., *Adsorption of Fermentation Inhibitors from Lignocellulosic Biomass Hydrolyzates for Improved Ethanol Yield and Value-Added Product Recovery*, Microporous and mesoporous materials, 122, 143-148, **2009**;
- [45] Yasuyuki M., Toyoki I., Tatsuya H., Kazuhiko F., *Solubilization and functionalization of sulfuric acid lignin generated during bioethanol production from woody biomass*, Bioresource Technology, 100, 1024-1026, **2009**;
- [46] Wyman C.E., *What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol*, TRENDS in Biotechnology, 25, 153-157, **2007**;
- [47] Enari T.M., Niku-Paavola M.L., *Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid*, CRC Crit Rev Biotechnol, 5, 67-87, **1987**;
- [48] Chen H., Jin S., *Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose*, Enzyme and Microbial Technology, 39, 1430-1432, **2006**;
- [49] Sánchez C., *Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi*, Biotechnology Advances, 27, 185-194, **2009**;
- [50] Singh D., Nigam P., Banat I.M., Marchant R., McHale A.P., *Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II - Use of Kluyveromyces marxianus IMB3*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 14, 823-834, **1998**;
- [51] Gharpuray M.M., Lee Y-H., Fan L.T., *Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis*, Biotechnology and Bioengineering, 25, 157-172, **1983**;
- [52] Okazaki M., Moo-Young M., *Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: analytical description of a mechanistic model*, Biotechnol Bioeng, 20, 637- 663, **1978**;
- [53] Lloyd T. A., Wyman C. E., *Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids*, Bioresource Technology, 96, 1967-1977, **2005**;
- [54] Martinez A.T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F, Martinez M.J., Gutierrez A., Del Rio J.C., *Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin*, International Microbiology, 8, 195-204, **2005**;
- [55] Berlin A., Balakshin M., Gilkes N., Kadla J., Maximenko V., Kubo S., Saddler J., *Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations*, Journal of Biotechnology, 125, 198-209, **2006**;
- [56] Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN, *Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis*, Biotechnol Progress, 15, 804-816, **1999**;
- [57] Converse AO., *Substrate factors limiting enzymatic hydrolysis. In: Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues*, Ed. Saddler JN. CAB International, 93-106, **1993**;
- [58] Chiang V.S., Holtzapple M.T., *Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity*, Appl Biochem Biotechnol, 84/86, 5-37, **2000**;
- [59] Sangseethong K., Meunier-Goddik L., Tantasucharit U., Liaw E.T., Penner M.H., *Rationale for particle size effect on rates of enzymatic saccharification of microcrystalline cellulose*, Journal of Food Biochemistry, 22, 321-330, **1998**;

- [60] Sawada I., Kuwahara M., Nakamura Y., Suda H., *Effect of a process of explosion for the effective utilization of biomass*, International Chemical Engineering, 27, 686-693, **1987**;
- [61] Sinitsyn A.P., Gusakov A.V., Vlasenko E.Y., *Effect of structural and physicochemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis*, Appl Biochem Biotechnol, 30, 43-59, **1991**;
- [62] Zhou L., O'Dwier J.P., Chang V.S., Granda C.B., Holtzaple M.T., *Structural features affecting biomass enzymatic digestibility*, Bioresour Technol, 99, 3817-3828, **2008**;
- [63] Yang B., Willies D.M., Wyman C., *Changes in the enzymatic hydrolysis rate of avicel cellulose with conversion*, Biotechnol Bioeng, 94, 1122-1128, **2006**;
- [64] Zhang Y-H P., Lynd L.R., *Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems*, Biotechnol Bioeng, 88, 797-824, **2004**;
- [65] Grabber J.H., *How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability*, A review of cell wall model studies, Crop Science 45: 820-831, **2005**;
- [66] Möller R., *Cell wall saccharification*, EPOBIO: Realising the Economic Potential of Sustainable Resources – *Bioproducts from Non-food Crops*, November **2006**;
- [67] Lee H.J., Brown R.M. Jr., *A comparative structural characterization of two cellobiohydrolases from Trichoderma reesei: a high resolution electron microscopy study*, J Biotechnol, 57, 127– 136, **1997**;
- [68] Sulzenbacher G., Schülein M., Davies G., *Structure of the endoglucanase I from Fusarium oxysporum: native, cellobiose, and 3,4-epoxybutyl- β -D-cellobioside-inhibited forms, at 2.3 Å resolution*, Biochemistry, 36, 5902-5911, **1997**;
- [69] ReverbeI-Leroy C., Pagés S., Belaich A., Belaich J.-P., Tardif C., *The processive endocellulase CelF, a major component of the Clostridium cellulolyticum cellulosome: Purification and characterization of the recombinant form*, J Bacteriol, 179, 46-52, **1997**;
- [70] Himmel M.E., Adney W.S., Baker J.O., Nieves R.A., Thomas S.R., *Cellulases: structure, function and applications*, In Wyman CE, editor, Handbook on bioethanol, 144–161, **1993**;
- [71] Henrissat B., Davies G., *Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases*, Curr Opin Struct Biol, 7, 637-644, **1997**;
- [72] White A., Rose D.R., *Mechanism of catalysis by retaining β -glycosyl hydrolases*, Curt Opin Struct Biol, 7, 645-651, **1997**;
- [73] Driguez H., *Thiooligosaccharides in glycobiology*, Topics Curt Chem, 187, 85-116, **1997**;
- [74] Notenboom V., Birsan C., Warren R., Withers S.G., Rose D.R., *Exploring the cellulose/xylan specificity of the β -1,4-glycanase Cex from Cellulomonas fimi through crystallography and mutation*, Biochemistry, 37, 4751-4758, **1998**;
- [75] Klarskov K., Piens K., Stahlberg J., Hoj P., Beeumen J., Claeysens M., *Cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei: identification of an active-site nucleophile and additional information on sequence including the glycosylation pattern of the core protein*, Carbohydr Res, 304, 143-154, **1997**;
- [76] Sulzenbacher G., Shareck F., Morosoli R., Dupont C., Davies G., *The Streptomyces lividans family 12 endoglucanase: construction of the catalytic core, expression, and X-ray structure at 1.75 Å resolution*, Biochemistry, 36, 16032-16039, **1997**;

- [77] Mackenzie L., Davies G., SchQlein M., Withers S, *Identification of the catalytic nucleophile of endoglucanase I from Fusarium oxysporum by mass spectrometry*, *Biochemistry*, 36, 5893-5901, **1997**;
- [78] Armand S., Drouillard S., Schulein M., Henrissat B., Driguez H., *A bifunctionalized fluorogenic tetrasaccharide as a substrate to study cellulases*, *J Biol Chem*, 272, 2709-2713, **1997**;
- [79] Divne C., Stahlberg J., Teeri T.T., Jones T.A., *High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei*, *J Mol Biol*, 275, 309-325, **1998**;
- [80] Rouvinen J., Bergfors T., Reeri T.T., Knowles J., Jones T.A., *Threedimensional structure of cellobiohydrolase II from Trichoderma reesei*, *Science*, 249, 380 – 386, **1990**;
- [81] Tomme P., Van Tilbeurgh H., Pettersson G., Van Damme J., Vandekerckhove J., Knowles J., Teeri T.T., Claeysens M., *Studies of the cellulolytic system of Trichoderma reesei QM 9414: analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis*, *Eur J Biochem*, 170, 575-581, **1988**;
- [82] Tormo J., Lamed R., Chirino A.J., Morag E., Bayer E.A., Shoham Y., Steitz T.A., *Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose*, *EMBO J*, 15, 5739-5751, **1996**;
- [83] Brun E., Moriaud F., Gans P., Blackledge M., Barras F., Marion D., *Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by Erwinia chrysanthemi*, *Biochemistry*, 36, 16074-16086, **1997**;
- [84] Jarvis E., Haynes C., Kilburn D., *Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose*, *J Biol Chem*, 272, 24016-24023, **1997**;
- [85] Din N., Gilkes N.R., Tekant B., Miller R.C., Anthony R. Jr., Warren R., Kilburn D.G., *Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase*, *Bio/Technol*, 9, 1096- 1099, **1991**;
- [86] Johnson P., Joshi M., Tomme P., Kilburn D., McIntosh L., *Structure of the N-terminal cellulose-binding domain of Cellulomonas fimi Cen C determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy*, *Biochemistry*, 35, 14381-14394, **1996**;
- [87] Teeri T.T., Koivula A., Linder M., Wohlfahrt G., Divne C., Jones T.A., *Trichoderma reesei cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose*, *Biochem Soc Trans*, 26, 173-178, **1998**;
- [88] Zverlov V., Mahr S., Riedel K., Bronnenmeier K., *Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile Anaerocellum thermophilum with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains*, *Microbiology*, 144, 457-465, **1998**;
- [89] Reese E.T., Siu R.G.H., Levinson H.S., *Biological degradation of soluble cellulose derivatives*, *J Bacteriol*, 59, 485-497, **1950**;
- [90] Reese E.T., Maguire A.H., Parrish F.W., *Glucosidase and exo-glucanases*, *Can J Biochem*, 46, 25-34, **1968**;
- [91] Reese E.T., *History of the cellulase program at the US army research and development center*, *Biotechnol Bioeng Symp*, 6, 9- 15, **1976**;
- [92] Coughlan M., *The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and applications*, *Biotechnol Genet Eng Rev*, 3, 39 -109, **1985**;
- [93] Koenigs J.W., *Hydrogen peroxide and iron: a microbial cellulolytic system*, *Biotechnol Bioeng Symp*, 5, 151- 159, **1975**;

- [94] Chanzy H., Henrissat B., Vuong R., Schulein M., *The action of 1,4-β-D-glucan cellobio-hydrolase on Valonia cellulose microcrystals: an electron microscopic study*, FEBS Lett, 153, 113–117, **1983**;
- [95] Lee I., Evans B.R., Woodward J., *The mechanism of cellulase action on cotton fibers: evidence from atomic force microscopy*, Ultramicroscopy, 82, 213– 221, **2000**;
- [96] Halliwell G., Riaz M., *The formation of short fibres from native cellulose by the components of Trichoderma koningii cellulose*, Biochem J, 116, 35– 42, **1970**;
- [97] Lee I., Evans B.R., Lane L.M., Woodward J., *Substrate–enzyme interactions in cellulase systems*, Biores Technol, 58, 163– 169, **1996**;
- [98] Woodward J., Affholter K.A., Noles K.K., Troy N.T., Gaslightwala S.F., *Does cellobiohydrolase II core protein from Trichoderma reesei disperse cellulose microfibrils*, Enzyme Microb Technol, 14, 625–630, **1992**;
- [99] Sprey B., Bochem H.-P., *Formation of cross-fractures in cellulose microfibril structure by an endoglucanase-cellobiohydrolase complex from Trichoderma reesei*, FEMS Microbiol Lett, 106, 239– 244, **1993**;
- [100] Boisset C., Fraschini C., Schulein M., Henrissat B., Chanzy H., *Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from Humicola insolens and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A*, Appl Environ Microbiol, 66, 1444– 1452, **2000**;
- [101] Walker L.P., Wilson D.B., Irwin D.C., *Measuring fragmentation of cellulose by Thermomonospora fusca cellulose*, Enzyme Microb Technol, 12, 378– 386, **1990**;
- [102] Walker L.P., Wilson D.B., Irwin D.C., *Fragmentation of cellulose by the major Thermomonospora fusca cellulase cellulases, Trichoderma reesei CBH1 and their mixtures*, Biotechnol Bioeng, 40, 1019– 1026, **1992**;
- [103] Din N., Damude H.G., Gilkes N.R., Miller R.C., Warren R.A.J., Kilburn D.G., *C1–Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulose*, Proc Natl Acad Sci USA, 91, 11383– 11387, **1994**;
- [104] Banka R.R., Mishra S., Ghose T.K., *Fibril formation from cellulose by a novel protein from Trichoderma reesei: a non-hydrolytic cellulolytic component*, World J Microbiol Biotechnol, 14, 551–558, **1998**;
- [105] Saloheimo M., Paloheimo M., Hakola S., Pere J., Swanson B., Nyssonen E., Bhatia A., Ward M., Penttila M., Swollen, *A Trichoderma reesei protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials*, Eur J Biochem, 269, 4202–4211, **2002**;
- [106] Wang W., Liu J., Chen G., Zhang Y., Gao P., *Function of a low molecular weight peptide from Trichoderma pseudokoningii S38 during cellulose biodegradation*, Curr Microbiol, 46, 371– 379, **2003**;
- [107] Zhang S., Wolfgang D.E., Wilson D.B., *Substrate heterogeneity causes the nonlinear kinetics of insoluble cellulose hydrolysis*, Biotechnol Bioeng, 66, 35– 41, **1999**;
- [108] Valjamae P., Sild V., Pettersson G., Johansson G., *Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I*, Eur J Biochem, 266, 327–334, **1999**;
- [109] Fan L.T., Lee Y.-H., Beardmore D.H., *Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis*, Biotechnol Bioeng, 22, 177– 199, **1980**;
- [110] Ooshima H, Sakata M, Harano Y., *Adsorption of cellulase from Trichoderma viride on cellulose*, Biotechnol Bioeng, 25, 3103–3114, **1983**;

- [111] Carrard G., Koivula A., Soderlund H., Beguin P., *Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose*, Proc Natl Acad Sci USA, 97, 10342– 10347, **2000**;
- [112] Kleman-Leyer K.M., Gilkes N.R., Miller R.C. Jr, Kirk T.K., *Changes in the molecular-size distribution of insoluble celluloses by the action of recombinant Cellulomonas fimi cellulases*, Biochem J, 302, 463 – 469, **1994**;
- [113] Kleman-Leyer K.M., Siika-Aho M., Teeri T.T., Kirk T.K., *The cellulase endoglucanase I and cellobiohydrolase II of Trichoderma reesei act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size*, Appl Environ Microbiol, 62, 2883–2887, **1996**;
- [114] Srisodsuk M., Kleman-Leyer K., Keranen S., Kirk T.K., Teeri T.T., *Modes of action on cotton and bacterial cellulose of a homologous endoglucanase-exoglucanase pair from Trichoderma reesei*, Eur J Chem, 251, 885– 892, **1998**;
- [115] Stalbrand H., Mansfield S.D., Saddler J.N., Kilburn D.G., Warren R.A.J., Gilkes N.R., *Analysis of molecular size distributions of cellulose molecules during hydrolysis of cellulose by recombinant Cellulomonas fimi β -1,4-glucanases*, Appl Environ Microbiol, 64, 2374–2379, **1998**;
- [116] Walker L.P., Wilson D.B., *Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview*, Biores Technol, 36, 3–14, **1991**;
- [117] Wood T.M., Garcia-Campayo V., *Enzymology of cellulose degradation*, Iodegradation, 1, 147–161, **1990**;
- [118] Woodward J., *Synergism in cellulase systems*, Biores Technol, 36, 67–75, **1991**;
- [119] Tomme P., Van Tilbeurgh H., Pettersson G., Van Damme J, Vandekerckhove J., Knowles J., Teeri T.T., Claeysens M., *Studies of the cellulolytic system of Trichoderma reesei QM 9414: analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis*, Eur J Biochem, 170, 575–581, **1988**;
- [120] Wood T.M., McCrae S.I., *The cellulase of Penicillium pinophilum: synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically-distinct cellobiohydrolases*, Biochem J, 234, 93–99, **1986**;
- [121] Mansfield S.D., Saddler J.N., Gubitz G.M., *Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi Gloeophyllum sepiarium and Gloeophyllum trabeum*, Enzyme Microb Technol, 23, 133– 140, **1998**;
- [122] Tuka K., Zverlov V.V., Velikodvorskaya G.A., *Synergism between Clostridium thermocellum cellulases cloned in Escherichia coli*, Appl Biochem Biotechnol, 37, 201– 207, **1992**;
- [123] Walker L.P., Wilson D.B., Irwin D.C., *Fragmentation of cellulose by the major Thermomonospora fusca cellulase cellulases, Trichoderma reesei CBH1 and their mixtures*, Biotechnol Bioeng, 40, 1019– 1026, **1992**;
- [124] Lamed R., Kenig R., Morag E., Calzada J.F., De Micheo F., Bayer E.A., *Efficient cellulose solubilization by a combined cellulosome- β -glucosidase system*, Appl Biochem Biotechnol, 27, 173–183, **1991**;
- [125] Riedel K., Bronnenmeier K., *Intramolecular synergism in an engineered exo-endo-1,4- β -glucanase fusion protein*, Mol Microbiol, 28, 767– 775, **1998**;
- [126] Te'o V.S.J., Saul D.J., Bergquist P.L., *Cel A, another gene coding for a multidomain cellulase from the extreme thermophile Caldocellum saccharolyticum*, Appl Microbiol Biotechnol, 43, 291–296, **1995**;
- [127] Zverlov V., Mahr S., Riedel K., Bronnenmeier K., *Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme*

- thermophile Anaerocellum thermophilum with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains*, Microbiology, 144, 457–465, **1998**;
- [128] Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., Pretorius I.S., *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*, Microbiol Mol Biol Rev, 66, 506–577, **2002**;
- [129] Fierobe H.P., Mechaly A., Tardif C., Belaich A., Lamed R., Shoham Y., Belaich J.-P., Bayer E.A., *Design and production of active cellulosome chimeras: selective incorporation of dockerin-containing enzymes into defined functional complexes*, J Biol Chem, 276, 21257– 21261, **2001**;
- [130] Mandels M., *Applications of cellulases*, Biochem Soc Trans, 13, 414– 415, **1985**;
- [131] Schwarz W.H., *The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria*, Appl Microbiol Biotechnol, 56, 634– 649, **2001**;
- [132] Fierobe H.P., Bayer E.A., Tardif C., Czjzek M., Mechaly A., Belaich A., Lamed R., Shoham Y., Belaich J.P., *Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. substrate targeting versus proximity of enzyme components*, J Biol Chem, 277, 49621– 49630, **2002**;
- [133] Eriksson T., Borjesson J., Tjerneld F., *Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses*, Enzyme Microb Technol, 31, 353– 364, **2002**;
- [134] Medve J., Karlsson J., Lee D., Tjerneld F., *Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from Trichoderma reesei: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes*, Biotechnol Bioeng, 59, 621–634, **1998**;
- [135] Taherzadeh M., Karimi, K., *Acid-Base Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review*, Bioethanol review, Bioresources, 2, 472–499, **2007**;
- [136] Hahn-Hagerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Lide´n G., Zacchi G., *Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today*, Bioethanol Review, Trends in Biotechnology, 24, 549–556, **2006**;
- [137] Luo L., Van Der Voet E., Huppes G., *An energy analysis of ethanol from cellulosic feedstock–Corn stover*, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Article in press, **2009**;
- [138] Akinori M., Hiroyuki I., Katsuji M., Osamu T., Shigeki S., *Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting Saccharomyces cerevisiae*, Bioresource Technology, 100, 2392–2398, **2009**;
- [139] Tomás-Pejó E., Oliva J.M., González A., Ballesteros I., Ballesteros M., *Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process*, Fuel, Article in press, **2009**;
- [140] Himmel M.E., Ruth M.F., Wymans C.E., *Cellulase for commodity products from cellulosic biomass*, Current Opinion in Biotechnology, 10, 358–364, **1999**;
- [141] Schwarz W.H., *The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria*, Appl Microbiol Biotechnol, 56, 634– 649, **2001**;
- [142] Sara A., Odagiu A., *ProEnvironment*, 2, 89 – 93, **2008**;
- [143] Rasmussen M.A., Hespell R.B., White B.A., Bothast R.J., *Applied and environmental microbiology*, 54, 890–897, **1988**;
- [144] Leatherwood D. J. M., *Applied microbiology*, 13, 5, **1965**;
- [145] Wood T. M., Wilswon C. A., Stewart C. S., *Biochem. J.*, 205, 129–13, 7, **1982**;

- [146] Hespell R.B., Wolf R., Bothast D.R.J., *Applied and environmental microbiology*, 53, 2849-2853, **1987**;
- [147] Varga G.A., Kolver E.S., *Applied and environmental microbiology*, 54, 1917-1922, **1988**;
- [148] European Commission, The first national report concerning the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport in Romania, **2007**;
- [149] **Macarie C.A.**, Segneanu A.-E. Balcu I., Sfirloaga P., Burtica G., Grozescu I. "Comparative Study On Waste Lignocellulose By Physico And Chemical Methods" (lucrare data spre publicare);
- [150] Tian S., Wang Z.-Y., Fan Z.-L and Zuo Li-Li *Comparison of Ultrasonic and CO₂ Laser Pretreatment Methods on Enzyme Digestibility of Corn Stover* Int. J. Mol. Sci., 13, 4141-4152; **2012** doi:10.3390/ijms13044141;
- [151] Kicsi A.L. „*Studii privind utilizarea unor sorbenți indigeni naturali pentru decontaminarea apelor uzate cu conținut de metale grele*” **2010**
- [152] Balcu I., Segneanu A.E., Mirica M.C., Iorga M.I., **Macarie C.A.**, Martagiu R., "Microwaves Effect over Biomass Hidrolysis", *Environmental Engineering and Management Journal* July/August, Vol 8 No 4 741-746, ed "Gheorghe Asachi" Tehnical University of Iasi Romania, **2009**;
- [153] **Macarie C.A.**, Segneanu A. E., Balcu I., Pop R., Burtica G., Ungurean M. "Use of alkaline lyophilization process for lignocellulosic biomass pretreatment" *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2012**;
- [154] Segneanu A.E., **Macarie C.A.**, Pop R.O. and Balcu I. "Combined Microwave - Acid Pretreatment of the Biomass" *Progress in Biomass and Bioenergy Production*, Syed Shahid Shaukat (Ed.), ISBN: 978-953-307-491-7, InTech **2011**;
- [155] James M. Jay, *Modern Food Microbiology Sixth Edition*, **2000**, Aspen Publishers, Maryland.
- [156] Rotar Stingheriu R. – *Microbiologia produselor alimentare*, Editura Universității Suceava, **2004**
- [157] **Macarie C.A.**, Segneanu A.E., Balcu I., Pop R., Burtica G., Gherman V.D. *Comparative Study on Microorganisms Used for the Bioethanol Production Low Carbon Economy*, 2, 224-229, **2011**, doi:10.4236/lce.2011.24028;
- [158] **Macarie C.A.**, Segneanu A.E., Balcu I., Gherman V., Burtica G., Ungurean M., *Degradation of cellulose by rumen micro-organisms* (lucrare data spre publicare);
- [159] Teramoto Y., Lee S.H., Endo T., Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking, *Bioresource Technology*, 99, 8856–8863, **2008**;
- [160] Yang B., Wyman E., "BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substances", *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 611-617, **2006**;
- [161] Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review", *Bioresource Technology*, 83, 1–11, **2002**;
- [162] Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A.P.C., Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass and Bioenergy*, 28, 384–410, **2005**;
- [163] Mwaikambo L.Y., Ansell M. P., The determination of porosity and cellulose content of plant fibers by density methods, *Journal of Materials Science Letters*, 20, 2095-2096, **2001**;
- [164] Segneanu A.E, Pop R., Balcu, I, **Macarie C.A.**, Milea, M., Martagiu, R., Vaszilcsin, C.G., „*Green synthesis of symmetrical carbonate FT-IR study*”,

- Environmental Engineering and Management Journal „Gheorghe Asachi”
Technical University of Iasi, Romania, July/August, vol.9, No. 8, 1139-1143,
2010;
- [165] **Macarie C.A.**, Bebeselea A., Balcu I., Slavici T., Darvasi D., Segneanu A.
"Aspects Regarding The Economic Study Of The Bioethanol Obtained By
Development Of A New Environmentally Friendly Pretreated Methode " *Revista
de chimie* **2012** (trimisa spre publicare);
- [166] General Directorate of Regional Policy, Guide to Cost-Benefit Analysis of
Investment Projects; pp. 54-55, **2010**;
- [167] Boardman, A.E.; Greenberg, D.H.; Vining A.R.; Weimer, D.L. Cost-benefit
analysis. Concepts and Practice. 3th ed. USA: Arc Publishing House, pp.2-45,
2006;
- [168] Martagiu, R., Segneanu A.E., **Macarie C.A.**, Balcu I., Mirica M.C., "Laboratory
installation regarding the acid hydrolysis of biomass", *Annals of West University
of Timisoara*, vol 17, no 3, 41-44, **2008**;