

PRETRATAMENTUL ȘI HIDROLIZA ENZIMATICĂ A MATERIILOR PRIME CELULOZICE ÎN VEDEREA OBȚINERII DE ZAHARURI FERMENTESCIBILE UTILIZATE LA OBȚINEREA BIOETANOLULUI

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

Ing. Mihaela UNGUREAN

Conducător științific:

Referenți științifici:

prof.univ.dr.ing. Francisc Peter

prof.univ.dr.ing. Lucian-Mircea Rusnac

prof.univ.dr.ing. Carmen Boeriu

prof.univ.dr.ing. Gabriela Bahrim

Ziua susținerii tezei: 15.02.2013

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, 2013

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 desfășurate în perioada stagiului de doctorat cu frecvență la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității "Politehnica" din Timișoara.

Adresez respectuoase mulțumiri domnului Prof. Dr. Ing. Francisc Peter, conducătorul științific al lucrării, pentru îndrumarea și sprijinul acordat pe întreaga perioadă de desfășurare a stagiului de doctorat, încurajările oferite la momentul oportun, pentru întreprinderea de demersuri în vederea obținerii stagiului de cercetare în străinătate, care mi-a îmbogățit atât orizontul științific cât și cel lingvistic. Sprijinul moral și științific, încurajările, cât și lecțiile primite de la dânsul îmi sunt de un real ajutor pentru viitorul carierei mele.

Sunt profund îndatorată și doresc să mulțumesc doamnei Prof.dr. László Gubicza de la Universitatea Pannonia, Veszprém, Ungaria, pentru profesionalismul cu care m-a ghidat pe drumul către obținerea titlului de doctor în științe, pentru competența și îndrumarea științifică și pentru sprijinul moral și emoțional acordat pe întreaga perioadă de desfășurare a stagiului și a elaborării tezei de doctorat. *Above all and the most needed, she provided me unflinching encouragement and support in various ways. Her truly scientist intuition has made her as a constant oasis of ideas and passions in science, which exceptionally inspire and enrich my growth as a researcher want to be.*

Îmi exprim întreaga considerație față de membrii comisiei de doctorat, domnului președinte al comisiei Prof. Dr. Ing. Nicolae Vaszilcsin, decan al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara, doamnelor Dr. Ing. Carmen Boeriu de la Universitatea din Wageningen, Prof. Dr. Ing. Gabriela Bahrim de la Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați și domnului Prof. Dr. Ing. Lucian-Mircea Rusnac de la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara, pentru onoarea ce mi-au făcut-o acceptând propunerea de a face parte din comisia de analiză a tezei și pentru timpul acordat.

Mulțumesc D-lui S.I. dr. ing. Vasile Bercean și D-nei Asist. dr. ing. Sabina Nitu, precum tuturor colegilor din catedra de biocataliză, Ana, Mari, Firuța, Ramo, Livia, Adelei, Anca și Cristina pentru multiplele încurajări și sfaturi colegiale deosebit de utile.

Nu în ultimul rând doresc să mulțumesc și sunt profund recunoscătoare familiei mele și logodnicului meu care a avut încredere în mine și m-a sprijinit pe toată perioada derulării stagiului de doctorat, părinților mei fiindu-le dedicată această reușită.

Sper ca de-a lungul vieții, experiențele stagiului de doctorat să îmi fie de folos în plan personal și să îmi aducă împliniri pe plan educațional și profesional.

Timișoara, februarie 2013

Mihaela Ungurean

Familiei mele

Ungurean, Mihaela

Pretratamentul și hidroliza enzimatică a materiilor prime celulozice în vederea obținerii de zaharuri fermentescibile utilizate la obținerea bioetanolului

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 70, Editura Politehnica, 2013, 172 pagini, 65 figuri, 66 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-606-554-623-3

Cuvinte cheie: pretratament, hidroliză enzimatică, celuloză, imobilizare sol-gel, stabilitate, reutilizare

Rezumat:

Criza petrolului din ultimii ani, precum și creșterea efectului de poluare a aerului a determinat înlocuirea combustibililor fosili cu biocombustibilii. La ora actuală, unul din cei mai importanți biocombustibili studiați este bioetanolul. În ultimii ani s-a îndreptat atenția asupra obținerii bioetanolului din reziduuri lignocelulozice, astfel având loc valorificarea deșeurilor de biomasă și creșterea producției de biocombustibil. Deoarece procesul de obținere a etanolului din materiale lignocelulozice este complex și costisitor, producerea bioetanolului celulozic este încă studiată la nivel de laborator.

Obiectivul principal al acestei teze a fost de a crește cantitatea de zaharuri fermentescibile produse în urma hidrolizei a celulozei și hemicelulozei din biomasă. În acest scop, s-a urmărit îmbunătățirea eficienței hidrolizei enzimatice a celulozei prin pretratarea biomasei, optimizarea pretratamentului cu DMSO/[Emim]Ac pentru recuperarea celulozei și ligninei dizolvate și reutilizarea solventului, îmbunătățirea performanțelor catalitice ale celulozei prin imobilizarea enzimei, studiul stabilității celulozei imobilizate, hidroliza enzimatică a celulozei microcristaline și regenerate utilizând celuloza imobilizată, studiul cinetic al reacției de hidroliză enzimatică a celulozei utilizând celuloza nativă și imobilizată, reutilizarea celulozei imobilizate pe substrat de celuloză.

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijin parțial din grantul strategic POSDRU/88/1.5/S/50783, cofinanțat din Fondul Social European "Investește în oameni", în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltare Resurse Umane 2007-2013.

Finanțarea cercetărilor a fost realizată în cadrul grantului PN II - Parteneriate nr. 21077 „BIOCOMBUSTIBILI OBȚINUȚI PRIN VALORIFICAREA DEȘEURILOR CELULOZICE ÎNTR-UN SISTEM INTEGRAT CHIMICO-ENZIMATIC”, derulat în perioada 2008-2010.

O parte din experimentele care au dus la finalizarea tezei de doctorat au fost realizate în cadrul colaborării cu Universitatea Pannonia, Research Institute on Bioengineering, Membrane Technology and Energetics, din Veszprem, Ungaria.

CUPRINS

INTRODUCERE ABREVIERI

I.	STUDIUL DOCUMENTAR	11
I.1.	Importanța bioetanolului	11
I.2.	Biomasa lignocelulozică	13
I.2.1	Structura biomasei lignocelulozice	15
I.2.1.1	Celuloza	15
I.2.1.2	Hemiceluloza	16
I.2.1.3	Lignina	17
I.3.	Enzimele celolitice	19
I.3.1	Celulazele	19
I.3.2	Hemicelulazele	20
I.4	Imobilizarea enzimelor	23
I.4.1	Tehnici de imobilizare	24
I.4.1.1	Imobilizare prin legare de suport	25
I.4.1.2	Imobilizare prin înrețelare (reticulare)	25
I.4.1.3	Imobilizare prin incluziune (entrapare)	26
I.4.2	Imobilizarea celulelor. Studiul actual al cercetării	30
I.5	Conversia biomasei la bioetanol	35
I.5.1	Pretratarea biomasei lignocelulozice	36
I.5.2.	Metode de pretratare a biomasei lignocelulozice	37
I.5.2.1	Procedee fizice de pretratare	37
I.5.2.2	Procedee chimice de pretratare	37
I.5.2.2.1	Hidroliza acidă	38
I.5.2.2.2	Pretratare biomasei cu hidroxizi	40
I.5.2.3	Metode fizico-chimice de pretratare	41
I.5.2.3.1	Expandarea cu aburi	41
I.5.2.3.2	Pretratarea biomasei cu amoniac	41
I.5.2.3.3	Pretratarea biomasei cu dioxid de carbon	42
I.5.2.3.4	Pretratarea biomasei cu solvenți organici	42
I.5.2.3.5	Pretratarea biomasei cu lichide ionice	43
I.5.2.3.5.1	Lichide ionice- generalități	43
I.5.2.3.5.2	Dizolvarea celulozei în lichide ionice	45
I.5.2.3.5.3	Dizolvarea ligninei în lichide ionice	51
I.5.2.3.5.4	Dizolvarea biomasei lignocelulozice în lichide ionice	53
I.5.2.3.5.5	Influența lichidelor ionice asupra activității celulozice	58
I.5.2.4	Metode biologice de pretratare	61
I.5.3	Hidroliza enzimatică a celulozei	62
I.5.3.1	Influența caracteristicilor peretelui celular asupra hidrolizei	66
I.6	Concluzii	67
II	CONTRIBUȚII ORIGINALE	69
II.1	Principalele obiective științifice	69
II.2	Pretratarea biomasei lignocelulozice prin metode neconvenționale	70

II.2.1	Determinarea conținutului total de lignină și hidrați de carbon din biomasa lignocelulozică	70
II.2.2	Influența metodei de pretratare a biomasei lignocelulozice asupra hidrolizei enzimatică	71
II.2.2.1	Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretratată cu acid sulfuric diluat	71
II.2.2.2	Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretratată cu glicerină	74
II.2.2.3	Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretratată cu lichid ionic	77
II.2.2.4	Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretratată cu acid sulfuric diluat/lichid ionic	82
II.2.2.5	Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretratată cu glicerină pură/lichid ionic	84
II.2.3	Stabilirea condițiilor optime pentru pretratamentul biomasei lignocelulozice cu lichid ionic	87
II.2.3.1	Influența temperaturii de pretratare asupra hidrolizei enzimatică a celulozei din biomasa pretratată cu [Emim]Ac	87
II.2.3.2	Stabilirea timpului optim de pretratament	89
II.2.3.3	Stabilirea compoziției optime de amestec DMSO/[Emim]Ac	89
II.2.4	Determinarea parametrilor procesului de pretratament cu amestec DMSO/[Emim]Ac pentru recuperarea celulozei și ligninei din biomasă și reutilizarea lichidului ionic	91
II.2.4.1	Caracterizarea celulozei și ligninei recuperate din soluția de DMSO/[Emim]Ac prin spectrofotometrie FT-IR	93
II.2.5	Concluzii	95
II.3.	Imobilizarea celulozei prin tehnica entrapării în sol-gel	97
II.3.1	Influența precursorilor silanici și condițiilor de imobilizare asupra eficienței catalitice a celulozei imobilizate	97
II.3.2	Stabilirea condițiilor optime de imobilizare pentru metoda de entrapare selectată	101
II.3.2.1	Influența raportului molar al silanilor precursori	102
II.3.2.2	Influența încărcării cu enzimă	102
II.3.3	Testarea preparatelor imobilizate pe substrat de celuloză microcristalină	103
II.3.4	Studiul reproductibilității metodei de imobilizare sol-gel	107
II.3.5	Caracterizarea imagistică a celulozei entrapate în sol-gel prin microscopie cu fluorescență	107
II.3.6	Concluzii	109
II.4	Studiul stabilității celulozei imobilizate	110
II.4.1	Stabilitatea la diferite valori de pH	110
II.4.2	Stabilitatea termică	111
II.4.3	Studiul efectului inhibitor al produsului de hidroliză	114
II.4.4	Studiul stabilității la depozitare (non-operaționale) a celulozei	116
II.4.5	Studiul stabilității celulozei în mediu apos	117
II.4.6	Influența lichidelor ionice asupra activității și stabilității celulozei	118
II.4.6.1	Influența naturii lichidului ionic asupra activității catalitice a celulozei native	119

II.4.6.2	Influența concentrației de lichid ionic asupra activității celulozei native și imobilizate	120
II.4.7	Concluzii	122
II.5	Caracterizarea operațională a celulozei imobilizate	123
II.5.1	Hidroliza enzimatică a celulozei utilizând celuloza imobilizată prin metoda sol-gel	123
II.5.2	Studiul cinetic al hidrolizei enzimatică a celulozei microcristaline catalizată de celuloza nativă și celuloza imobilizată	126
II.5.3	Creșterea eficienței procesului de hidroliză enzimatică prin reutilizarea celulozei imobilizate prin entrapare în sol-gel	128
II.5.4	Concluzii	130
III.	PARTE EXPERIMENTALĂ	132
III.1.	Materiale și echipamente de laborator	132
III.2.	Rețete de lucru	133
III.2.1.	Metode de imobilizare a celulozei	133
III.2.2.	Metode de pretratare a biomasei lignocelulozice	134
III.2.2.1.	Pretratamentul biomasei lignocelulozice cu acid sulfuric diluat	134
III.2.2.2.	Pretratarea biomasei lignocelulozice cu glicerină	135
III.2.2.3.	Pretratarea biomasei lignocelulozice cu lichide ionice	135
III.2.2.4.	Pretratarea biomasei lignocelulozice cu metoda combinată acid sulfuric diluat/lichid ionic	136
III.2.2.5.	Pretratarea biomasei lignocelulozice cu metoda combinată cu glicerină/lichid ionic	136
III.2.3.	Hidroliza enzimatică a biomasei pretratate și netratate	137
III.2.4.	Dizolvarea biomasei lignocelulozice în DMSO/[Emim]Ac	137
III.2.5.	Recuperarea soluției de DMSO/[EMIM]Ac	138
III.2.6.	Hidroliza enzimatică a celulozei	138
III.2.7.	Reutilizarea celulozei imobilizate	139
III.3.	Metode de analiză	139
III.3.1.	Metoda Lowry de determinare a proteinelor	139
III.3.2.	Determinarea activității celulozice cu acid 3,5-dinitro-salicilic	141
III.3.3.	Determinarea conținutului total de lignină și hidrați de carbon din biomasă	145
III.3.4.	Determinarea conținutului de hidrați de carbon	148
III.3.5.	Analiza FT-IR (spectrofotometrie de infraroșu cu transformată Fourier)	153
III.3.6.	Marcarea proteinelor cu fluorocromi	154
IV.	CONCLUZII FINALE	155
	BIBLIOGRAFIE	158
	ANEXE	165
	LISTĂ LUCRĂRI	168

INTRODUCERE

Principala cauză a poluării mediului înconjurător sunt combustibilii fosili, datorită emisiilor de gaze (CO_2 , SO_2 , respectiv NO_x) generate. Criza petrolului din ultimii ani, precum și creșterea efectului de poluare a aerului a determinat înlocuirea combustibililor fosili cu biocombustibilii. Biocombustibilii sunt obținuți în urma procesării diferitor materii prime regenerabile cum sunt reziduuri de lemn, ierburi, reziduuri de porumb, paie, grâu, etc.

La ora actuală, unul din cei mai importanți biocombustibili studiați este bioetanolul. Utilizarea bioetanolului reprezintă una din cele mai eficiente căi de reducere a emisiilor de gaze cu efect de seră și a consumului de benzină folosit la transporturile rutiere. Bioetanolul din materii prime amidonoase (reziduuri de porumb, trestie de zahăr, grâu) se produce la scară industrială, Brazilia și SUA fiind cele mai mari producătoare.

Datorită procesului complex și mai costisitor de obținere a etanolului din reziduuri celulozice (paie, lemn, ierburi), nu se cunosc încă companii care să producă etanol celulozic în cantități industriale. Producerea bioetanolului celulozic este încă studiată la nivel de laborator. Unul din avantajele folosirii etanolului celulozic este că acesta este fabricat din materii prime nealimentare, astfel fiind valorificate și deșeurile lignocelulozice.

Bioetanolul celulozic se poate obține prin fermentația soluției de zaharuri fermentescibile rezultate în urma hidrolizei celulozei și hemicelulozei din biomasa lignocelulozică. Hidroliza acidă a celulozei s-a înlocuit cu cea enzimatică, deoarece utilizarea enzimelor pentru scindarea celulozei permite obținerea unor randamente mai mari în condiții de reacție mult mai blânde, fără formarea de produși secundari, respectiv costuri de producție mai reduse. Pentru a distruge piedicile structurale datorate prezenței ligninei, a îmbunătăți accesul enzimei la substrat și a mări randamentul de obținere a zaharurilor fermentescibile din celuloză sau hemiceluloză, s-a recurs la pretratarea materialului lignocelulozic. Obiectivul multor cercetări a fost găsirea unor noi metode de pretratare și a unor căi cât mai eficiente pentru procesul de obținere a etanolului celulozic. S-au dezvoltat diferite metode simple de pretratare (cu acizi diluați, cu solvenți organici, în mediu alcalin, cu apă fierbinte, prin expandare cu aburi, cu microorganisme) și metode combinate de pretratare, toate având ca scop principal delignifierea lemnului și hidroliza hemicelulozei, astfel accesul celulozei la substrat fiind îmbunătățit.

La ora actuală, sunt investigate mai multe variante de obținere bioetanolului celulozic prin hidroliza celulozei, respectiv hemicelulozei și fermentația separată sau simultană a pentozelor sau hexozelor obținute. Dintre acestea, hidroliza și fermentația simultană s-a dovedit a fi cea mai eficientă metodă pentru producerea etanolului celulozic, deoarece scad costurile de producție și scade efectul inhibitor al produșilor (în special glucoză și celobioză) asupra enzimelor celololitice, astfel crescând cantitatea de bioetanol.

Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa lignocelulozică s-a realizat cu ajutorul unui complex celulozic obținut din diferite microorganisme (*Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Aspergillus niger*, etc). O alternativă recentă o reprezintă imobilizarea celulozelor, având ca scop creșterea stabilității enzimei, a reutilizării biocatalizatorului, ceea ce face ca procesul de obținere a bioetanolului celulozic să fie mai eficient datorită creșterii cantității de zaharuri fermentescibile. Randamentul de obținere de zaharuri fermentescibile depinde de tipul de imobilizare

și condițiile de reacție. Aceasta face ca optimizarea parametrilor în reacția de hidroliză enzimatică a celulozei, alegerea metodei și condițiilor adecvate de imobilizare, să fie esențială pentru eficiența procesului, pentru a se obține un preparat celulazic cu eficiență catalitică și stabilitate ridicată, care să poată fi reutilizat.

Obiectivele tezei de doctorat au fost:

- Îmbunătățirea eficienței hidrolizei celulozei prin pretratarea materialului lignocelulozic
- Optimizarea pretratamentului cu DMSO/[Emim]Ac pentru recuperarea celulozei și ligninei dizolvate și reutilizarea solventului
- Îmbunătățirea performanțelor catalitice ale celulazei prin imobilizare, folosind tehnica entrapării în sol-gel
- Hidroliza enzimatică a celulozei microcristaline și celulozei din biomasă utilizând celulaza imobilizată
- Studiul cinetic al hidrolizei enzimaticice a celulozei microcristaline catalizată de celulaza nativă și imobilizată
- Studiul reutilizării celulazei imobilizate prin entrapare în sol-gel

Teza de doctorat este structurată în patru părți:

- **Studiu de literatură**, în care este detaliat stadiul actual al cercetării în domeniul obținerii bioetanolului celulozic, cu referire la căile de producere a bioetanolului, pretratarea biomasei lignocelulozice, avantajele pe care le prezintă biocombustibilii, respectiv îmbunătățirea performanțelor catalitice ale celulazelor prin imobilizarea lor.
- **Contribuții originale**, în care sunt prezentate rezultatele obținute pe parcursul cercetărilor experimentale, cuprinzând: pretratarea biomasei lignocelulozice; dizolvarea biomasei lignocelulozice în soluția de DMSO/[Emim]Ac; alegerea condițiilor optime de dizolvare, regenerarea celulozei și ligninei dizolvate în soluție; caracterizarea celulozei și ligninei regenerate prin tehnica FT-IR; imobilizarea celulazei prin tehnica entrapării în sol-gel; selecția celulazei imobilizate; testarea preparatelor celulazice obținute în urma imobilizării în reacția de hidroliză enzimatică a celulozei microcristaline; studiul stabilității celulazei native și imobilizate; hidroliza enzimatică a celulozei regenerate din soluția de DMSO/[Emim]Ac utilizând celulaza imobilizată; studiul cinetic al hidrolizei enzimaticice a celulozei catalizată de celulaza nativă și imobilizată; studiul reutilizării celulazei imobilizate.
- **Partea experimentală**, în care sunt prezentate metodele de lucru și metodele de analiză folosite.
- **Concluzii finale**, rezultate în urma studiilor experimentale, în conformitate cu obiectivele propuse.

ABREVIERI

3APrTMOS	3-aminopropil-trimetoxisilan
Avicel PH101	celuloză microcristalină
[Bmim]Cl	clorură de 1-butil-3metil imidazoliu
[Bmim]PF ₆	hexafluorofosfat de 1-butil-3metil imidazoliu
BSA	albumină serică
[Bu4P]Br	bromură de tetrabutil-fosforium
CaCO ₃	carbonat de calciu
Celluclast 1.5L	complex celulazic din <i>Trichoderma reesei</i>
CMC	carboximetilceluloză
DMSO	dimetilsulfoxid
DNS	acid 3,5-dinitrosalicilic
[Emim]Ac	acetat de 1-etil-3metil imidazoliu
[Emim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-etil-3metil imidazoliu
[Emim]OTs	toluolsulfonat de 1-etil-3metil imidazoliu
[Emim]TFA	trifluoroacetat de 1-etil-3metil imidazoliu
[Emim]TfO	triflat de 1-etil-3metil imidazoliu
[Emim]TOS	tosilat de 1-butil-3metil imidazoliu
EtOH	etanol
[EtPy]Br	bromură de 1-etil piridinium
H ₂ SO ₄	acid sulfuric
HCl	acid clorhidric
[Hmim]PF ₆	hexafluorofosfat de 1-hexil-3metil imidazoliu
k _{cat}	constanta catalitică
k _{cat} /K _m	eficiență catalitică
K _m	constanta Michaelis-Menten
MeTMOS	metiltrimetoxisilan
[Mmim]DMP	dimetilfosfat de 1,3 dimetil imidazoliu
N-2-AET-3APrTMOS	N-2-aminoetil-3-aminopropil-trimetoxisilan
NaF	fluorură de sodium
[P ₁₄₍₆₆₆₎]Br	bromură de trihexiltetradecil-fosforium
[P ₁₄₍₆₆₆₎]M ₃ PPh	bis(2,4,4-trimetilpentil)fosfinat de trihexiltetradecilfosforium
[P ₁₄₍₆₆₆₎]NTf ₂	bis(trifluorometilsulfonil)imidă de trihexiltetradecilfosforium
[P ₁₄₍₆₆₆₎]PF ₆	hexafluorofosfat de trihexiltetradecil-fosforium
PEG	polietilenglicol
PhTMOS	feniltrimetoxisilan
TMOS	tetrametoxisilan
TWEEN 80	surfactant polisorbit 80
V _{max}	viteza maximă

I. STUDIU DOCUMENTAR

I.1. Importanța bioetanolului

Încă din cele mai vechi timpuri etanolul a fost folosit ca ingredient în băuturile alcoolice, iar izolarea sa a fost realizată pentru prima dată de către alchimistul persan Muhammad Zakariya Razi. În 1796, Johann Tobias Lowity a obținut etanol pur prin adsorbția etanolului distilat pe cărbune activ. Antoine Lavoisier a descris etanolul ca un compus format din carbon, hidrogen și oxigen, iar în 1808 Nicolas-Theodore de Saussure a descoperit structura chimică a etanolului. După cincizeci de ani, Archibald Scott Couper a publicat formula structurală a etanolului. Etanolul a fost obținut sintetic pentru prima dată în 1826 în Marea Britanie de către Henry Hanel și în Franța de Serullas. În 1828, Michael Faraday a obținut etanolul printr-un proces similar cu cel folosit azi [1].

Consumul mondial de energie a crescut în ultimul secol cu 17%, iar emisiile de CO₂, SO₂ și NO_x din combustibilii fosili au fost principala cauză a poluării atmosferei. Rezervele de petrol cunoscute se estimează că se vor epuiza în mai puțin de 50 de ani [2]. Criza petrolului din ultimii ani a determinat guvernele multor țări să promoveze producerea și utilizarea biocombustibililor [1]. Biocombustibilii sunt combustibili obținuți în urma procesării diferitor materii prime organice regenerabile cum ar fi: reziduuri de lemn, paie, reziduuri de trestie de zahăr, deșeuri animale, ierburi, etc [3].

Ei se clasifică în 3 categorii [3]:

- combustibili obținuți în urma procesării biomasei lignocelulozice
- combustibili obținuți în urma procesării materialelor agricole
- combustibili obținuți în urma procesării deșeurilor

O serie de biocombustibili sunt deja fabricați la scară industrială: bioetanolul, biodieselul sau biogazul [4]. Principalele avantaje ale biocombustibililor sunt: reducerea consumului de ulei, valorificarea reziduurilor și diminuarea efectului de poluare a aerului [5].

La ora actuală, bioetanolul este cel mai important biocombustibil de pe piață, produs cantitativ în urma procesului de fermentație [1]. Cea mai mare cantitate de etanol se obține din trestie de zahăr și materii amidonoase provenite din cereale (porumb, grâu) [5, 6]. Între 1998 și 2005, în Brazilia, exportul de bioetanol a crescut de peste 17 ori. În aprilie 2004, compania Iogen – companie canadiană de biotehnologii - a devenit prima producătoare de etanol celulozic obținut în cantități mici. Producția maximă de etanol obținut din amidon de porumb este de 55 miliarde litri pe an și se estimează o producție de 74 miliarde litri pe an de etanol până în 2017 [7].

Situația producției de bioetanol obținut din diferite materii prime regenerabile în anul 2008-2010, cu previziuni pentru anul 2020 se prezintă în Figura I.1 [8].

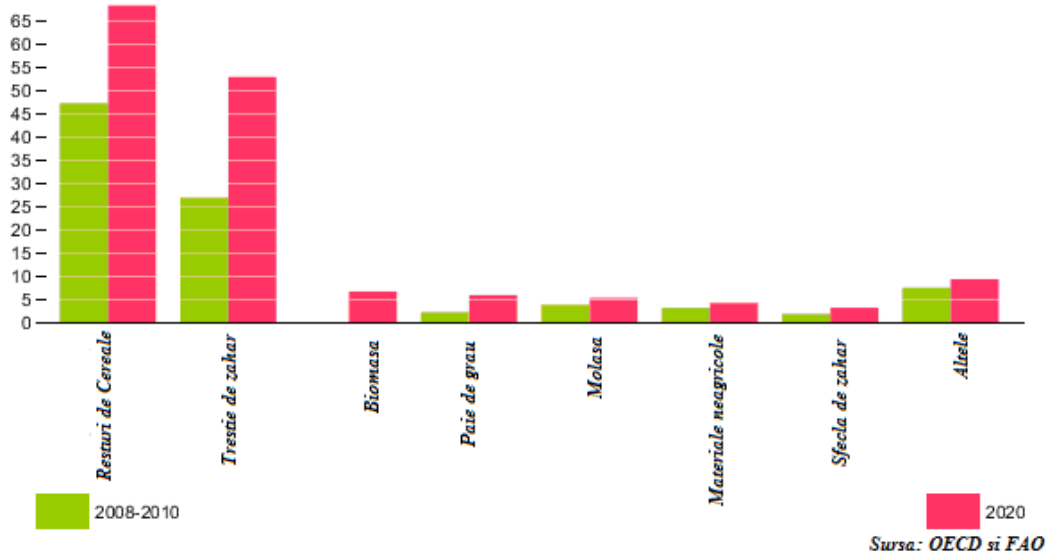


Figura I.1. Producția de bioetanol din diferite materii prime regenerabile [8]

BioEthanol Japan a fost prima companie din lume care a produs bioetanol celulozic din reziduuri de biomasă lignocelulozică [9]. În anul 2008 a fost finalizată prima instalație care va produce peste 378 milioane de litri pe an de bioetanol din reziduuri celulozice [10]. Principala utilizare a etanolului celulozic este ca și carburant deoarece reduce emisiile de gaze cu efect de seră și consumul de benzină folosit în transporturile rutiere. Prin amestecarea etanolului celulozic cu benzină se reduce consumul de combustibili fosili în automobilele și se realizează arderea combustibilului într-un mod mai eficient. Marile companii producătoare de automobile prevăd în construcția motoarelor utilizarea ulterioară a bioetanolului ca și combustibil: 10% (E10) în America de Nord, și 5% (E5) în Europa [1, 3, 11]. Reziduurile agricole folosite la fabricarea etanolului celulozic conțin lignină - un material care poate fi ars generând energie [5, 10]. Cei mai mari producători mondiali de etanol sunt: Brazilia și SUA (Figura I.2). Aproximativ 67% din volumul total de etanol se folosește în sectorul transporturilor, iar restul în industria alimentară [3, 12].

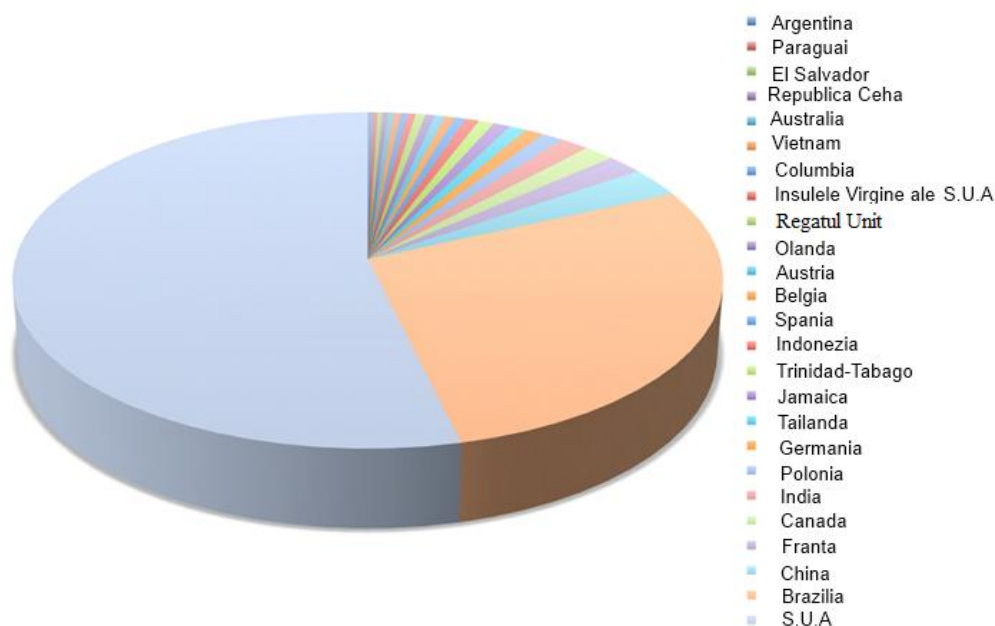


Figura I.2. Producția de Bioetanol în lume realizată în anul 2011 [12]

I.2. Biomasa lignocelulozică

Biomasa constituie o sursă regenerabilă de energie bazată pe ciclul carbonului, aceasta putând fi utilizată ca materie primă atât pentru obținerea biocarburanților cât și ca sursă directă de producere a căldurii și energiei [10, 13, 14]. Principalele procedee de conversie a biomasei lignocelulozice sunt prezentate în Figura I.3 [15]. Biomasa lignocelulozică cuprinde cea mai mare parte din reziduurile agricole și silvice ce pot fi utilizate pentru procesul de bioconversie la bioetanol [16, 17]. Biomasa lignocelulozică, incluzând biomasa ierboasă și biomasa lemnoasă din lemnul de esență tare și lemnul de esență moale conține o combinație de celuloză, hemiceluloză și lignină. Lemnul de esență moale, clasă din care fac parte specii de pin, molid, brad, salcâm, cucută, are o compoziție chimică unică, ce diferă de biomasa ierboasă sau de lemnul de esență tare. În lemnul de esență moale, cantitatea de manoză din hemiceluloză este mai ridicată, iar cantitatea de xiloză este mai scăzută (Tabelul I.1) [17, 18]. Lemnul de esență moale este caracterizat și de două fenilpropene unite (cumaril și ortometoxifenol) care formează structura bazică a ligninei, iar lemnul de esență tare și plantele ierboase prezintă structuri unite adițional. Interesant, această simplificare a structurii ligninei face delignificarea mai dificilă, datorită stabilității mai ridicate a ligninei în mediu acid. Acest fapt face ca lemnul de esență moale să fie considerat una din cele mai bune materii primă utilizate pentru obținerea bioetanolului [17]. Reziduurile ierboase din agricultură (spice de grâu, tulpini de porumb), silvicultură (rumeguș, așchii), deșeurile municipale (hârtie, carton), diverse deșeuri industriale, precum și plantele

fibroase și lemnoase sunt considerate o sursă abundentă și ieftină de celuloză și hemiceluloză [19, 20].

Tabelul I.1. Compoziția lemnului, exprimată în procente [18]

Tip de lemn	Celuloză (%)	Glucomanan (%)	Xilan (%)	Alte componente (%)	Lignină (%)
Lemn de esență moale	33-42	14-20	5-11	3-9	27-32
Lemn de esență tare	38-51	1-4	14-30	2-4	21-31

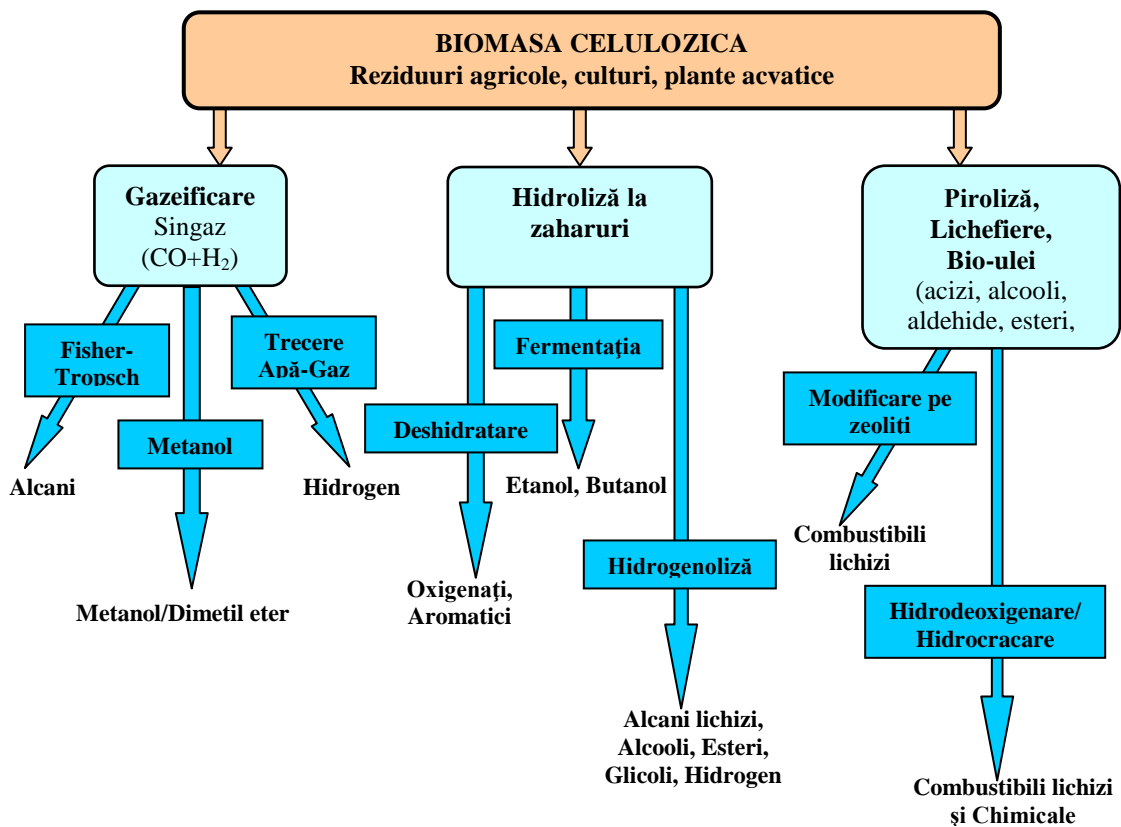


Figura I.3. Principalele procedee de conversie a biomasei [15]

I.2.1. Structura biomasei lignocelulozice

Biomasa lignocelulozică este alcătuită din: celuloză (40-50%), hemiceluloză (25-35%), lignină (15-20%) și cantități mici de proteine, lipide (ceruri, uleiuri), acizi, săruri minerale [18, 19, 21, 22]. În Figura I.4 este prezentată structura biomasei lignocelulozice.

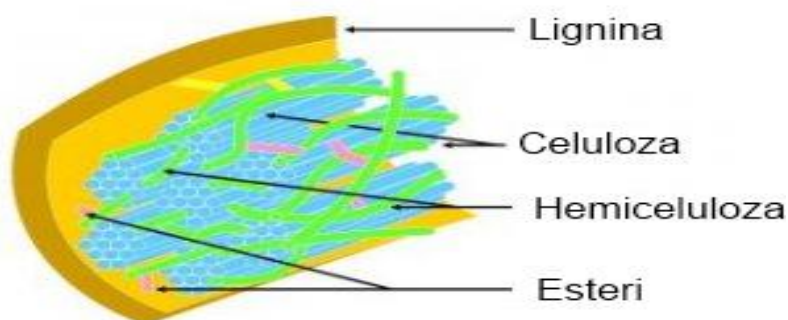


Figura I.4. Compoziția biomasei lignocelulozice

Tabelul I.2 prezintă conținutul de celuloză, hemiceluloză și lignină prezente în câteva reziduuri din agricultură sau silvicultură utilizate la obținerea bioetanolului [23]. Celuloza și hemiceluloza reprezintă aproximativ două treimi din masa uscată a biomasei lignocelulozice, fiind considerate materiale ce pot fi utilizate pentru obținerea bioetanolului, iar lignina este un biopolimer care nu poate fi utilizat pentru obținerea etanolului, însă poate avea alte aplicații industriale importante [19].

Tabel I.2. Compoziția principalelor reziduuri utilizate la obținerea bioetanolului [23]

Materialul lignocelulozic	Celuloza (%)	Hemiceluloza (%)	Lignina (%)
Lemn de esență tare	40-55	24-40	18-25
Lemn de esență 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	45	31,4	12

I.2.1.1. Celuloza

Este componentul majoritar al structurii pereților celulari ai plantelor și reprezintă aproximativ 50% din masa lemnului uscat [20, 21]. Macromolecula de celuloză este un biopolimer liniar, cu lanț filiform lung, constituit din peste 3000 unități de Δ -glucopiranoză unite prin legături β -1-4 glicozidice, fiind foarte rezistentă la degradare [20, 24]. Grupările funcționale din lanțul celulozei sunt grupele hidroxil. În funcție de gradul legăturilor puternice de hidrogen din și dintre moleculele de celuloză, această polizaharidă poate să aibă o structură cristalină sau amorfă [25].

În biomasă, celuloza se plasează în matricea formată de hemiceluloză și lignină [24]. În Figura I.5 este reprezentată structura celulozei [18].

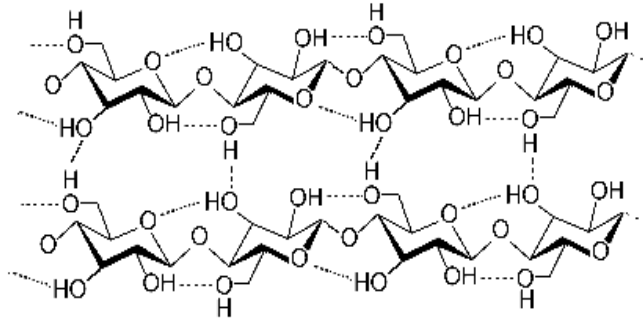


Figura I.5. Reprezentarea schematică a celulozei [18]

I.2.1.2. Hemiceluloza

Este un polimer cu lanț ramificat, mai scurt decât celuloza, de aproximativ 200 unități de unități de zaharide cu 5 și 6 atomi de carbon (glucoză, xiloză, manoză, galactoză, ramnoză, arabinoză și acizi ai zaharurilor). Polizaharidul majoritar regăsit în structura hemicelulozei din lemnul de esență tare, ierburilor și paielor de grâu este xilanul, în lemnul de esență moale fiind prezent glucomananul. Hemiceluloza este constituită dintr-o catenă principală ce conține o catenă de bază formată din unități de xilan unite prin legături β -1-4 glicozidice și numeroase catene ramificate de manoză, arabinoză, galactoză, acid glucuronic, etc. (Figura I.6) [26, 27].

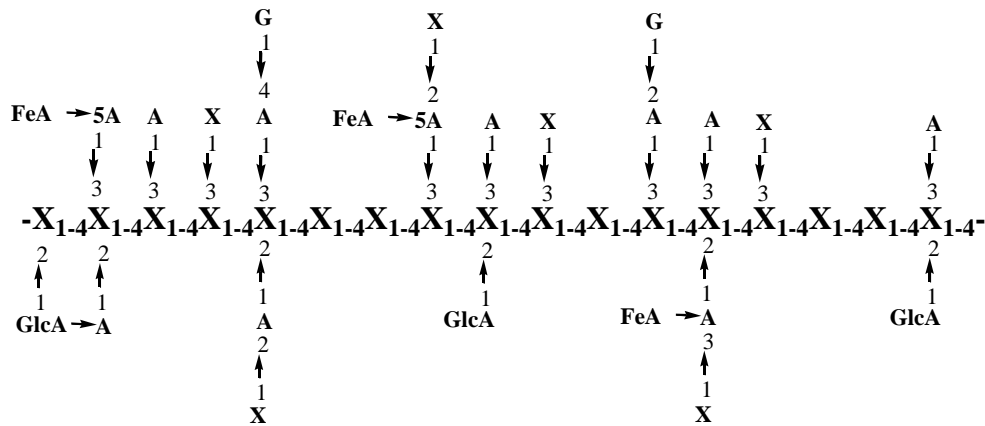


Figura I.6. Structura hemicelulozei . (A-arabinoză; FeA-acid ferulic; G-galactoză; Glc-acid glucuronic; X-xiloză) [28]

I.2.1.3. Lignina

Este un biopolimer aromatic, rigid, complex, cu o structură 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) unite prin diferite legături chimice [19, 23, 24, 26, 29]. Stabilitatea pereților celulari este datorată legăturilor covalente dintre lignină și hemiceluloză, lignina conferind biomasei rezistență la atacurile microbiene și rezistență la stres oxidativ [23, 26, 29]. În Figura I.7 sunt prezentate structurile celor trei componente principale ai ligninei [29]. Structura ligninei din lemnul de esență moale este prezentată în Figura I.8 [18].

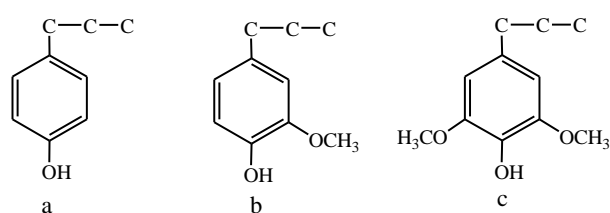


Figura I.7. Cele trei componente care alcătuiesc lignina a) 4-hidroxifenil, b) guaiacil, c) siringil [29]

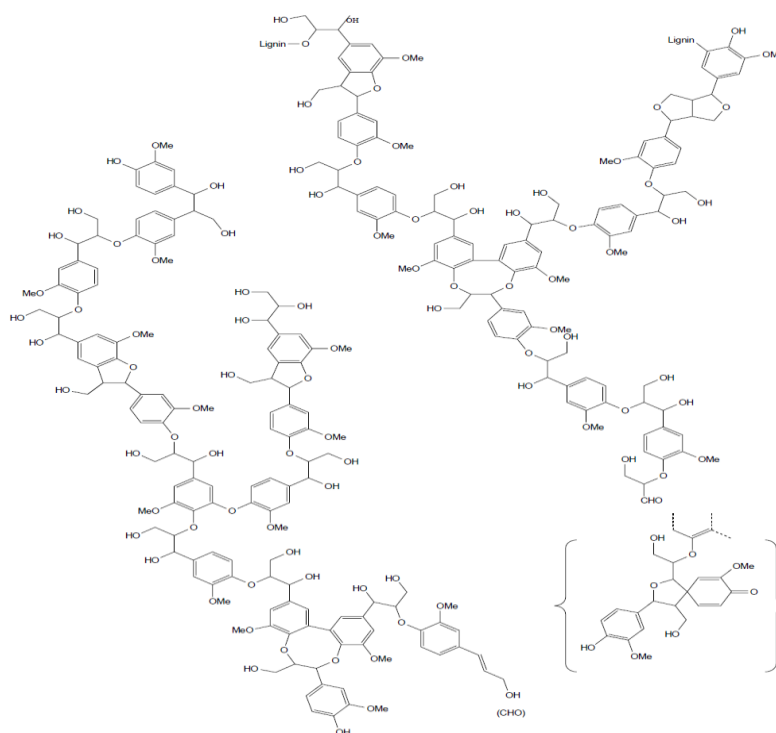


Figura I.8. Structura ligninei [18]

Mecanismul de interacțiune al ligninei cu carbohidrații din biomasa a fost pentru prima dată studiat de Erdmann în 1866. Legăturile dintre lignină și carbohidrați au fost determinate prin diferite metode cum ar fi: metoda reducerii sau metilării, metode cromatografice, metoda spectroscopică sau prin microscopie electronică [18].

Legăturile propuse de Laine ș.a. dintre lignină și carbohidrați au fost următoarele (Figura I.9) [18]:

- legătura eter benzilică dintre gruparea α -hidroxil a ligninei și gruparea hidroxil a carbohidratului
- legătura ester benzilică dintre gruparea α -hidroxil a ligninei și gruparea acid carboxilică a carbohidratului
- legătura glicozidică între gruparea hidroxilică aromatică sau alifatică și gruparea reducătoare a carbohidraților
- legătura acetalică dintre gruparea carbonil a ligninei și gruparea hidroxil a carbohidratului

Extracția ligninei din biomasa lignocelulozică se poate realiza utilizând dioxid de sulf sau diferiți sulfiți ai metalelor la temperaturi de 140°C, 160°C (procesul cu sulf), cu hidroxid de sodiu și sulfura de sodiu, în condiții puternice alcaline și temperaturi ridicate (procedeul Kraft), cu hidroxid de sodiu la temperaturi ridicate de 140-170°C și presiune joasă (procedeul cu sodă), cu etanol, acid formic, acid acetic, metanol, lichide ionice [30].

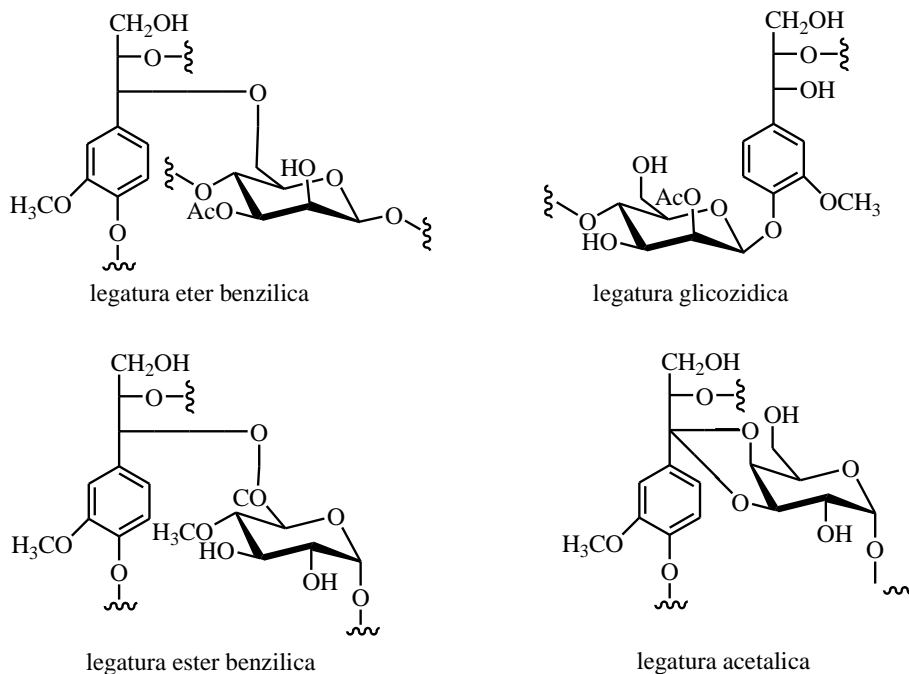


Figura I.9. Legăturile propuse dintre lignină și carbohidrați [18]

Structura complexă și compactă a ligninei îngreunează degradarea enzimatică a polizaharidelor la zaharuri fermentescibile, din acest motiv prețul etanolului lignocelulozic este mult mai mare comparativ cu alcoolul provenit din materiile amidonoase [22].

I.3. Enzimele celololitice

Enzimele sunt biocatalizatori responsabili de reacțiile din organismele vii, fiind mult mai eficiente decât catalizatorii chimici, iar specificitatea ridicată și puterea catalitică mare se datorează faptului că geometria situsului activ al enzimelor se potrivește cu cea a substratului, conform așa-numitului model "cheie-broască" [31].

Pentru scindarea celulozei și hemicelulozei din structura biomasei este necesară acțiunea sinergică a unui amestec de *enzime* (celulaze, hemicelulaze și alte glicozil hidrolaze). Se cunosc diverse specii de bacterii celololitice (bacterii cu toleranță la concentrații de oxigen, temperatură și concentrații de sare) [32].

Pentru o degradare completă a biomasei lignocelulozice sunt necesare mai multe enzime hidrolitice care acționează împreună pentru a realiza hidroliza completă. Enzimele lignocelololitice pot fi clasificate în funcție de natura substratului asupra căruia acționează [36]:

- celulaze
- hemicelulaze
- ligninaze (oxidaze, peroxidaze și lacaze care acționează asupra ligninei).

I.3.1. Celulazele

Reprezintă un complex enzimatic alcătuit din trei enzime care acționează sinergic asupra fibrei celulozice [35, 36]. Complexul celulazic se poate obține din bacterii sau fungii (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, etc) [34, 35]. Obținerea acestor enzime la scară industrială se realizează încă din anul 1980, fiind folosite pentru hrana animalelor sau în industria alimentară [35].

Complexul celulazic este alcătuit din trei tipuri de enzime care acționează împreună pentru a hidroliza celuloza: endoglucanaze, exoglucanaze (celobiohidrolaze) și β -D-glucozidaze [34, 35].

Modul de acțiune este următorul (Figura I.10):

- endoglucanazele hidrolizează legăturile interne din lanțul celulozei, acționând asupra părților amorfe ale celulozei;
- celobiohidrolazele hidrolizează părțile terminale ale lanțurilor de celuloză, cu formarea celobiozei;
- β -D-glucozidazele hidrolizează oligozaharidele scurte din celuloză (celobioza) în molecule de glucoză [22, 34];

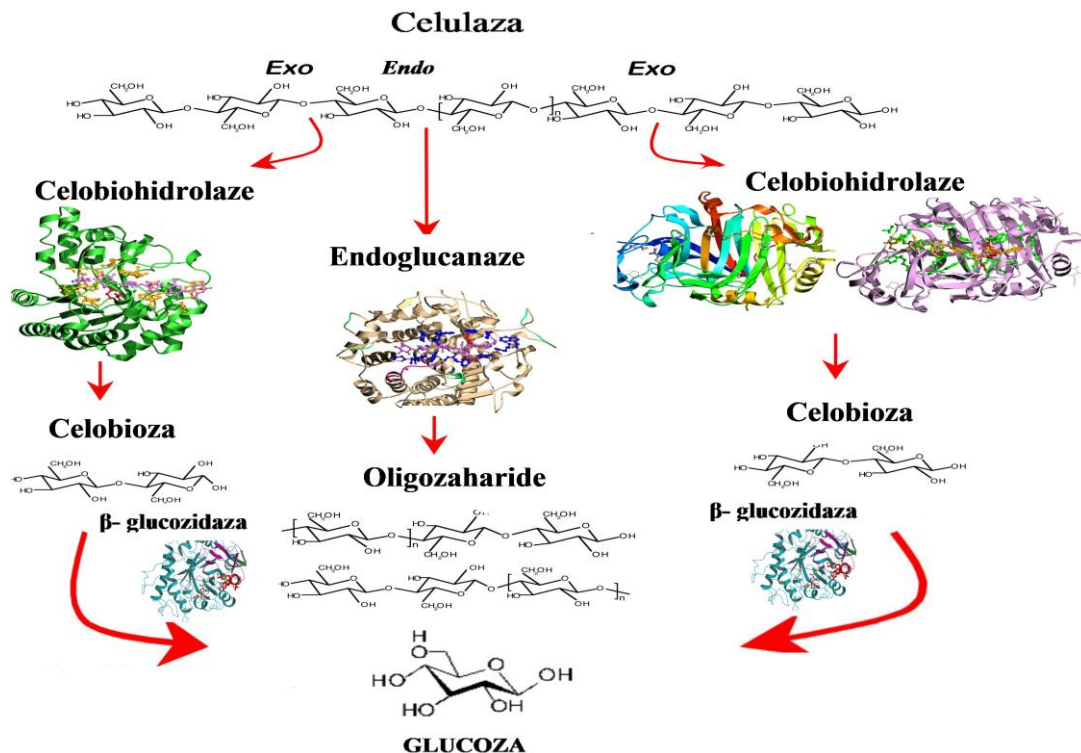


Figura I.10. Modul de acțiune al complexului celulazic [33]

Deși există mai multe posibilități de obținere a celulezelor, varianta cea mai avantajoasă din punct de vedere economic în procesul de obținere al bioetanolului este ca producerea celulezelor, hidroliza enzimatică și fermentația să se desfășoare în același reactor [19]. Avantajele principale ale utilizării celulezelor în hidroliza enzimatică îl reprezintă operarea în condiții blânde de reacție (temperatura de aproximativ 50°C, respectiv pH = 5), fără să rezulte produși secundari care să inhibe enzima [19, 22].

I.3.2. Hemicelulazele

Hemicelulazele sunt un grup de enzime alcătuit din glicozid hidrolaze sau carbohidrat esteraze, responsabile de hidroliza hemicelulozei din biomasă. Aceste complex enzimatic poate fi produs de o serie de microorganisme aerobe (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Bacilli*, *Cellvibrio*) sau anaerobe (*Clostridia*) [36].

Enzimele care alcătuiesc hemicelulazele sunt [22, 36, 37]:

- **Xilanazele (EC 3.2.1.8):** hidrolizează legăturile β-1,4 glicozidice ale unității de xilan la lanțuri scurte de xilooligomeri. Aparțin familiei glicozil hidrolazelor (GH), fiind cunoscute 300 secvențe de gene dintre care mai mult de 20 de gene au fost atribuite xilanazelor. Se cunosc structurile xilanazei GH8 din *Pseudoalteromonas haloplanktis* și xilanazei GH10 din *Thermoascus aurantiacus*.
- **β-mananaze (EC 3.2.1.78):** hidrolizează unitățile de manan din hemiceluloză la oligomeri ai mananului legați β-1,4 glicozidic, care

în continuare, sunt hidrolizate de β -manozidaze (EC 3.2.1.25) la manoză. Se cunosc aproximativ 50 secvențe de gene de β -mananaze ce aparțin familiei GH 5 și 26, respectiv 15 secvențe de β -manozidaze ce aparțin familiei GH 1,2, și 5. Se cunosc structurile, determinate prin spectroscopia de raze X, ale β -mananazei GH26 din *Pseudomonas cellulosa* și a β -manozidazei GH2 din *Trichoderma reesei*.

- **α -L-Arabinofuranozidaze:** α -L-Arabinofuranozidazele (EC 3.2.1.55) și α -L-Arabinazele (EC 3.2.1.99) hidrolizează unitățile arabinofuranozil ale hemicelulozei, aparținând familiei GH 3, 43, 51, 54 și 62. Se cunoaște structura tridimensională a α -L-arabinazei GH43 din *Cellvibrio japonicus*.
- **α -D-Glucuronidazele:** scindează legăturile α -1,2 glicozidice ale acidului 4-O-metil-D-glucuronic ale unităților de xilan. Fac parte din familia GH67, fiind cunoscută structura enzimei obținute din *Cellvibrio japonicus*.
- **β -Xilozidazele (EC 3.2.1.37):** sunt exo-glicozidaze care hidrolizează lanțurile de xilooligomeri la unități de xilan., făcând parte din familia GH 3, 39, 43, 52 și 54.
- **Esterazele hemiceluloitice:** conțin xilan esteraze (EC 3.1.1.72), care hidrolizează resturile acetil ale xilozei și feruloil esteraze (EC 3.1.1.73), care hidrolizează legătura esterică dintre arabinoză și acidul ferulic. Se cunoaște structura feruloil esterazei CE1 din *Clostridium thermocellum*.

Studii recente efectuate au permis izolarea unor noi tipuri de celulaze și hemicelulaze din microorganisme anaerobe. Cercetările actuale din domeniul ingineriei genetice sunt orientate asupra reducerii costurilor celulazelor provenite din sisteme enzimatic simple și obținerii unor microorganisme care pot produce cantități mari de enzime celuloitice și hemiceluloitice, care pot fi apoi utilizate cu ușurință în transformarea unor reziduuri din agricultură în zaharuri fermentescibile din care se poate obține bioetanol [22].

Degradarea hemicelulozei presupune un mecanism complex de acțiune a enzimelor capabile să scindeze hemiceluloza în monozaharide sau dizaharide (Figura I.11) [36].

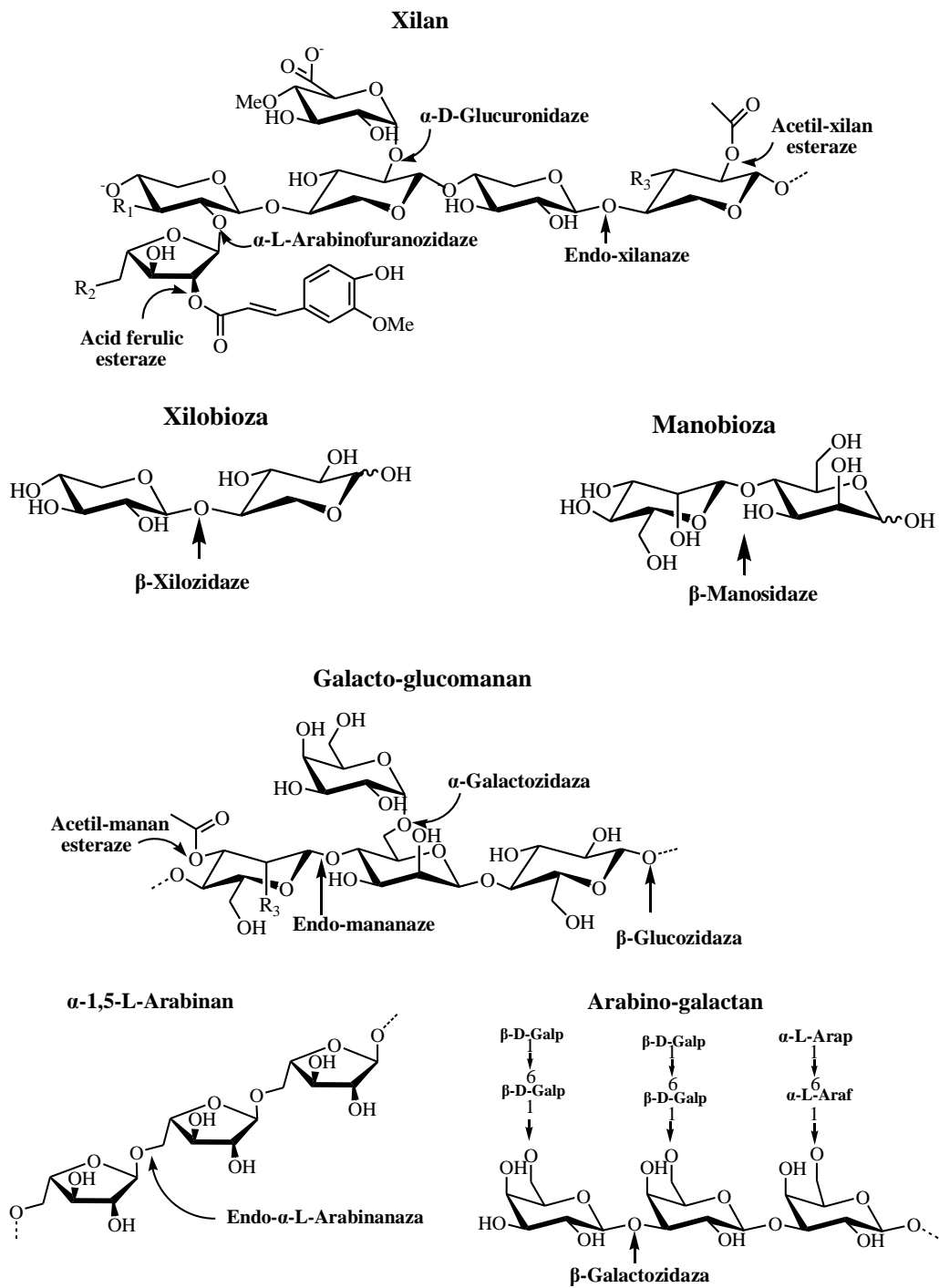


Figura I.11. Acțiunea complexului de hemicelulaze asupra hemicelulozei [36]

I.4. Imobilizarea enzimelor

Enzimele imobilizate sunt definite ca enzime mărginite fizic sau localizate într-o regiune definită din spațiu (fixate pe suport, legate de suport), impermeabilă pentru enzimă și care permit un schimb continuu de substrat și produs [38].

Termenul de enzime imobilizate include [38]:

- enzime modificate într-o formă insolubilă în mediul apos;
- enzime solubile reținute pe o membrană;
- enzime ale căror mobilitate este redusă prin legarea de unele macromolecule, preparatul enzimatic rezultat fiind solubil în apă;

Progresele înregistrate în extracția, separarea, obținerea, conversia și detectarea selectivă a unor specii biologic active cum sunt enzimele, peptidele, acizii nucleici și chiar celule întregi se datorează în cea mai mare parte succesului cu care se reușește imobilizarea speciilor biologice intacte pe/în interiorul unei suprafețe corespunzătoare [38]. Pentru ca utilizarea enzimelor imobilizate să fie eficientă, acestea trebuie să îndeplinească o serie de cerințe:

- densitatea biomoleculelor imobilizate să fie mare;
- să prezinte activitate enzimatică;
- să fie stabile la temperatură și în timp;
- să permită o bună accesibilitate a substraturilor;
- să răspundă rapid în timp;
- să fie rezistente la desprindere/desorbtje.

În funcție de dimensiunea, reactivitatea chimică a grupărilor funcționale, grupările ionice sau hidrofobicitate se cunosc câteva metode tipice de imobilizare a biomoleculelor pe suporturi anorganice și organice cum ar fi: adsorbția fizică, legarea covalentă, entraparea în membrane semipermeabile și microincapsularea în microsferă cu structură polimerică și hidrogeluri [38, 39]. Problemele legate de desprindere/desorbtje și cele legate de denaturarea enzimelor necesită optimizarea proceselor de imobilizare de fiecare dată când se utilizează o specie biologică nouă, ceea ce presupune o muncă laborioasă în laborator, pe o perioadă lungă de timp [38]. Cu excepția enzimei, cea mai importantă componentă care contribuie la performanțele catalitice ale enzimei imobilizate este suportul.

Caracteristicile unui bun suport sunt [38, 40]:

- permeabilitate
- domeniu larg de utilizare
- insolubilitate
- stabilitate chimică, mecanică și termică
- rigiditate mare
- formă potrivită
- rezistență la atac microbian
- regenerabilitate

Principalele avantaje ale enzimelor imobilizate, comparativ cu cele native (care de obicei se găsesc în stare lichidă sau solidă rezultată în urma liofilizării) sunt următoarele [38, 40]:

- ❖ selectivitate ridicată
- ❖ eficiență catalitică bună
- ❖ stabilitate termică și operațională
- ❖ insolubilitate în mediul de reacție
- ❖ rezistență la atacurile microbiene
- ❖ eficiență economică
- ❖ posibilitate de reutilizare

I.4.1. Tehnici de imobilizare

Atașarea enzimei de un suport insolubil în mediul de reacție presupune stabilirea unor interacțiuni între grupările funcționale sau materialul suportului și anumite grupări funcționale ale enzimei. Alegerea suportului și a metodei de imobilizare trebuie rezultată astfel încât centrul activ al enzimei să nu fie afectat. Acesta este de fapt format din două zone având funcții diferite: **centrul catalitic** care participă la reacție și **centrul de legare** care controlează specificitatea de substrat a enzimei. Pentru ca enzima să-și păstreze activitatea catalitică după imobilizare, este important ca structura terțiară de bază a acestor centre să nu fie afectată. Aceasta presupune cunoașterea grupărilor funcționale din componența centrului activ, legăturile pe care acestea le pot forma și compuşii care pot bloca accesibilitatea substratului la centrul catalitic al enzimei. De asemenea, imobilizarea trebuie făcută în condiții blânde și bine controlate, nefiind recomandate reacțiile la temperaturi ridicate sau în condiții de pH puternic acid sau bazic [39, 41].

O altă problemă ce poate să apară este ca centrul activ să nu fie afectat, în schimb accesul substratului la acest centru să fie blocat sau îngreunat. Din aceste motive, în general alegerea celei mai bune metode de imobilizare se face experimental [41].

Se cunosc diferite tehnici de imobilizare ce se pot împărți în trei mari categorii în funcție de mecanismul lor fizic (Figura I.12) [38, 41]:

- atașarea sau adsorbția pe un suport solid;
- entraparea în interiorul unei matrici poroase sau microcapsule;
- flocularea, naturală sau prin agenți de legare încrucișată;

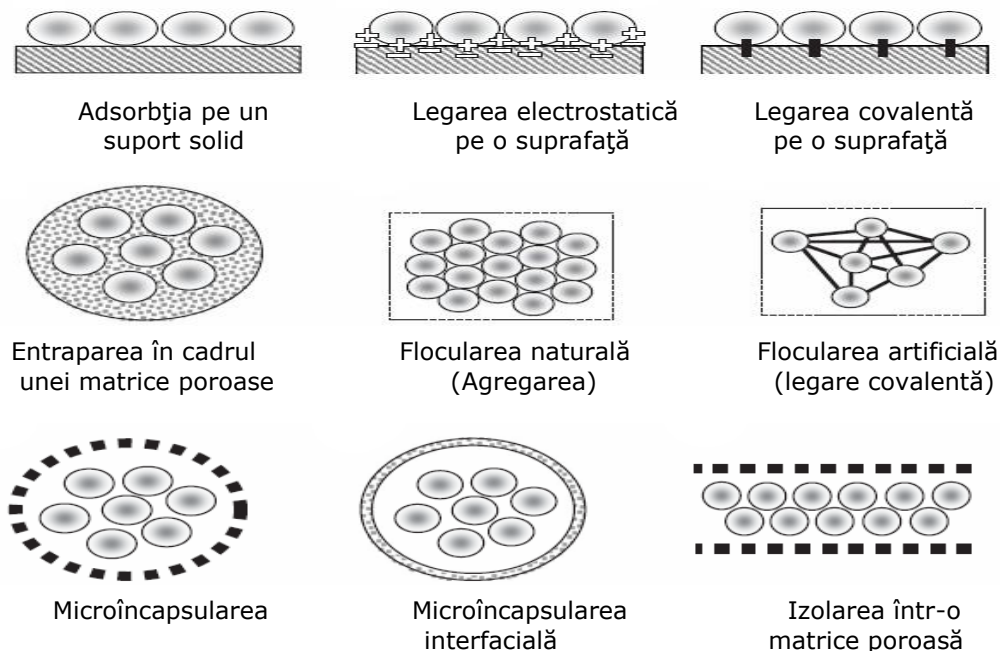


Figura I.12. Tehnici de bază ale imobilizării enzimelor [41]

I.4.1.1. Imobilizarea prin legare de suport

Este considerată cea mai veche metodă de imobilizare a enzimelor. Imobilizarea prin legare de suport se poate face în trei variante, în funcție de modul de fixare a enzimei: adsorbție fizică, legare ionică și legare covalentă [42, 43].

A. Adsorbția fizică

Această metodă se bazează pe adsorbția fizică a enzimei pe suprafața suportului insolubil [43]. Adsorbția se bazează pe formarea unor legături slabe (Van der Waals, legături de hidrogen, interacțiuni hidrofobe) între enzimă și suprafața materialului solid. În timpul procesului de adsorbție nu apar în general modificări conformaționale ale proteinei sau distrugerea centrului activ. Așadar, cu condiția găsirii unui suport adecvat, această metodă este simplă și eficientă [41, 43, 44].

B. Legarea ionică

Ca și adsorbția fizică, este o metodă simplă de imobilizare a enzimelor deoarece se bazează pe legarea ionică a proteinei pe un suport insolubil ce conține grupări schimbătoare de ioni. În unele cazuri, legarea se realizează nu numai prin legarea ionică ci și prin adsorbție fizică. Principala diferență între adsorbția fizică și legarea ionică constă în tăria legăturii dintre enzimă și suportul solid. Interacțiunile care apar în cazul legăturii ionice sunt mai puternice decât cele care se stabilesc prin adsorbție fizică [41].

C. Legarea covalentă

Acest tip de imobilizare se bazează pe formarea unor legăturilor covalente între enzimă și suportul insolubil.

Alegerea condițiilor de imobilizare este mai dificilă decât în cazul celorlalte metode de legare pe suport. Unul dintre dezavantajele majore ale legării covalente este că procesul este greu de controlat, iar de cele mai multe ori legăturile formate sunt nu doar intermoleculare dar și intramoleculare. Condițiile de reacție nu mai sunt blânde și pot fi uneori destul de complexe. Legătura covalentă ce se formează între enzimă și suport este puternică, iar preparatele enzimatic obținute sunt stabile [41, 45]. Pentru ca imobilizarea enzimei prin legare covalentă să fie eficientă se ține cont de următorii factori : alegerea grupărilor funcționale ale enzimei adecvate pentru ca legarea să poată avea loc în condiții blânde de reacție, interacțiunea dintre suport și enzimă și alegerea suportului compatibil cu proteina [44].

I.4.1.2. Imobilizarea prin înrețelare (reticulare)

Imobilizarea enzimelor se poate realiza nu numai prin legarea ei de un suport insolubil, ci și prin reticulare (înrețelare) inter- sau intramoleculară, formându-se de asemenea legături chimice stabile ca și în cazul legării covalente, însă diferența este că nu se mai utilizează suporturi insolubile. Procedura de imobilizare se face prin formarea unor agregate enzimatic tridimensionale, complet insolubile în apă, utilizându-se diferiți reactivi de înrețelare bi- sau multifuncționali, cum ar fi glutaraldehida, bis-diazobenzidina, N,N-etilen-bis-maleinimida [38, 41, 46].

Condițiile de reacție pentru formarea legăturilor covalente între enzime, suport și agenții de reticulare sunt destul de severe, de aceea conformația centrului activ al enzimei poate fi ușor afectată, determinând scăderea semnificativă a activității catalitice. Unul din avantajele acestui tip de imobilizare este că procesul se realizează practic într-o singură treaptă, utilizând un agent bi- sau multifuncțional [38, 41].

Metoda prezintă și unele dezavantaje: dificultatea controlării capacității de înrețelare astfel încât eficiența catalitică a preparatului obținut să fie bună, iar aspectul de gel al agregatelor obținute conferă acestora proprietăți mecanice slabe [38].

I.4.1.3. Imobilizarea prin incluziune (entrapare)

Tehnica entrapării enzimelor sau celulelor este una din cele mai simple metode de imobilizare [39, 42]. Metoda constă în includerea enzimei în rețeaua unui polimer sau închiderea ei într-o membrană semipermeabilă, suficient de strâns pentru a preveni desprinderea ei, însă permițând difuzia substratului și a produșilor [38, 44, 45].

Spre deosebire de metodele de legare covalentă sau de înrețelare, în acest caz enzima nu este legată de gel sau de membrană prin legături covalente, astfel imobilizarea prin entrapare poate avea aplicații pentru un număr mare de enzime. În aceste condiții, în general inactivarea enzimei este redusă comparativ cu celelalte metode de imobilizare.

Acest tip de imobilizare se poate realiza în mai multe moduri [38]:

- prin includerea într-o rețea macromoleculară de tip gel
- prin microîncapsulare
- entrapați în fibre tubulare
- entrapați în membrane lichide
- entrapați în membrane de ultrafiltrare

Totuși, dacă pentru entrapare se utilizează o reacție chimică de polimerizare, condițiile de reacție pot fi destul de severe și în unele cazuri se înregistrează pierderea activității enzimatică [47].

A. Entraparea enzimelor în derivați sol-gel

Folosirea speciilor biologice cum ar fi proteinele, acizii nucleici și chiar celule întregi în procesele de entrapare, s-a bazat în mare parte pe imobilizarea reactivului biologic în interiorul sau în afara unei suprafețe compatibile [48].

O posibilitate mai recentă de imobilizare implică entraparea componentelor biologice în matrici de silicați anorganici, formate la o temperatură scăzută printr-o metodă stabilă [51]. Primul document care relatează folosirea silicaților pentru entraparea unei componente biologice, a apărut la mijlocul anilor 1950 când Dickey a demonstrat faptul că mai multe enzime pot fi entrapate în derivații de acid silicic [52]. În 1990 Avnir ș.a. au descris entraparea proteinelor în sticle de tip silicați, derivați ai alcoxisilanilor [53]. Acest raport a fost urmat de lucrarea grupului lui Ellerby în 1992, care a demonstrat că alte proteine cum ar fi citocromul C și mioglobina ar putea fi entrapate în ortosilicați derivați [54]. Au apărut multe lucrări ce descriu entraparea unei mari varietăți de specii biologice incluzând enzime, anticorpi, proteine reglatoare, proteine legate de membrană, acizi nucleici și chiar celule întregi într-un număr mare de materiale compozite derivate de sol-gel [53].

Cele mai importante avantaje ale materialelor derivate de sol-gel pentru imobilizarea enzimelor sunt [38, 55, 56]:

- Pot fi transparente din punct de vedere optic, fiind ideale pentru dezvoltarea senzorilor chimici și biochimici
- Permit o mare varietate de modificări chimice, modificatori redox sau silani modificați organic
- Au mărime și distribuție potrivită care permite moleculelor mici și ionilor să difuzeze în matrice, în timp ce biomoleculele mai mari rămân blocate în pori
- Interacțiunile proteină-silicat și analit-silicat pot duce la denaturarea proteinei și abaterea față de calibrare, deci va fi nevoie de materiale nanocompozite organice-anorganice îmbunătățite pentru a depăși astfel de probleme

Imobilizarea biomoleculelor prin procesul sol-gel necesită optimizarea mai multor parametri [38, 57].

- Metoda trebuie să fie aplicabilă soluțiilor apoase, deoarece în general acestea sunt necesare pentru a menține funcția biologică a biomoleculelor
- Reacția de polimerizare trebuie să fie compatibilă cu domeniile de pH și cele de tărie ionică necesare pentru ca enzima să prezinte activitate (pH 4-10, domeniul de tărie ionică 0,01-1,00 M)
- Procesul trebuie să aibă loc la temperatura apropiată temperaturii camerei pentru menținerea enzimelor în conformația lor nativă
- Mărimea porilor trebuie să fie suficient de mică pentru a preveni antrenarea biomoleculelor în soluție, dar destul de mare pentru a permite compuşilor cu molecule mai mici să patrundă în matrice cu ușurință
- Materialul folosit ca și componentă pentru senzori, trebuie să fie transparent din punct de vedere optic sau conducător de electricitate
- Obținerea materialelor trebuie să fie simplă și reproductibilă, astfel ca să permită utilizarea lor în diferite aplicații ce includ sticla groasă, filme subțiri, coloane, fibre, pudră și rețele

Procesele de imobilizare prin tehnica sol-gel au fost studiate în știința materialelor, putând fi împărțite în două clase în funcție de natura precursorilor: precursori anorganici și precursori alcoxidici. Utilizarea precursorilor alcoxidici implică transformarea acestor silani precursori într-un polimer anorganic reticulat prin reacții de hidroliză și de condensare [38, 56, 57].

Precursorii alcoxidici pot fi [38]: tetraalcoxisilani, alchiltrialcoxisilani, trialcoxisilani funcționali, alcoximetalați (Figura I.13).

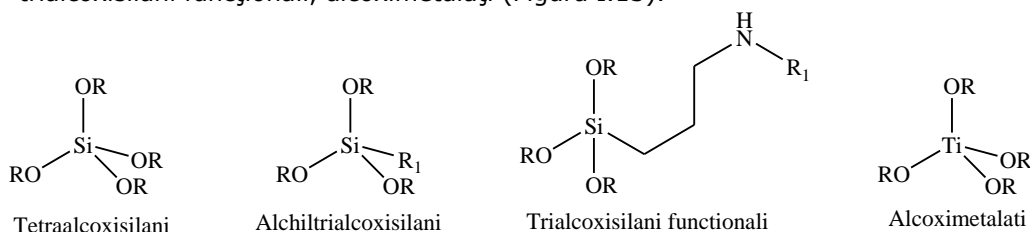


Figura I.13. Exemple de precursori de alcoxizi [38]

Principalele avantaje pe care tehnica imobilizării enzimelor în sol-gel le prezintă sunt [38, 58]:

- Stabilitate termică și chimică bună
- Metoda de obținere este simplă, neimplicând modificări ale enzimei care să conducă la denaturarea acesteia
- Flexibilitatea dimensiunii și geometriei porilor
- Posibilitatea de imobilizare a unei cantități mari de proteină

Formarea unui biocompozit sol-gel are loc printr-o succesiune de reacții, în prima etapă având loc reacția de hidroliză parțială sau totală a unui precursor silanic potrivit într-un solvent organic, cum ar fi alcoolul, rezultând un sol apos (dispersie coloidală a particulelor într-un lichid). Reacția de hidroliză implică un atac nucleofil al apei la centrul de siliciu. Precursorii pot fi silani sau amestecuri de silani cum sunt mono-, di-, tri-, tetra-, alcoxilani, sau pot conține una sau mai multe grupări funcționale de tip alchil, aril, amino carboxil, tiol sau alte grupări precum resturi redox active, flavine sau chinone [38].

Sunt posibile trei tipuri de catalize: acidă, bazică și nucleofilă. Hidroliza poate fi urmată de transesterificare cu aditivi cu compuși conținând grupe hidroxilice, cum ar fi glicerina pentru a forma poligliceril silicați care prezintă biocompatibilitate mai ridicată decât alcoxilani tipici [38].

În timpul reacției de hidroliză au loc simultan reacții de condensare și continuă hidroliza, rezultând un mare număr de polisilicați [38, 59]. Precursorul hidrolizat și condensat este apoi amestecat cu o soluție de enzimă în tampon, catalizatori și aditivi pentru controlul uscării, polimeri, agenți de modelare, specii redox, aceștia fiind importanți pentru modificarea proprietăților materialului finit. Reacția de polimerizare, cu formarea unui gel este inițiată prin schimbarea pH-ului iar perioada de formare a gelului este variabilă. Gelifierea precursorului de sol este însoțită de entraparea biomoleculei [38].

Gelurile inițiale sunt moi, ușoare și conțin o cantitate mare de apă (50-80%) și pori mari (până la 200 nm diametru). Studiile au demonstrat că reacțiile de condensare continuă în timpul maturării, care poate fi de la câteva zile până la câteva săptămâni, perioada în care are loc îndepărtarea din matrice a alcoolului entrapat și rezultat din reacțiile de hidroliză inițială și a apei obținute în reacțiile de condensare, rezultând o rețea mai puternică cu diametrul porilor mai redus cu 25% și proporția relativă a grupărilor siloxan față de grupările de silanol mai mare [38, 60].

În final, materialul este uscat, rezultând totodată evaporarea celei mai mari părți din apa interstițială, continuarea reacțiilor de înrețelare din matrice, micșorarea porilor și o contractare globală a materialului până la 85% din volumul său inițial. Gelul uscat se numește xerogel (Figura I.14) [38]. Xerogelurile sunt materiale interesante datorită porozității lor și suprafeței specifice ridicate [38].

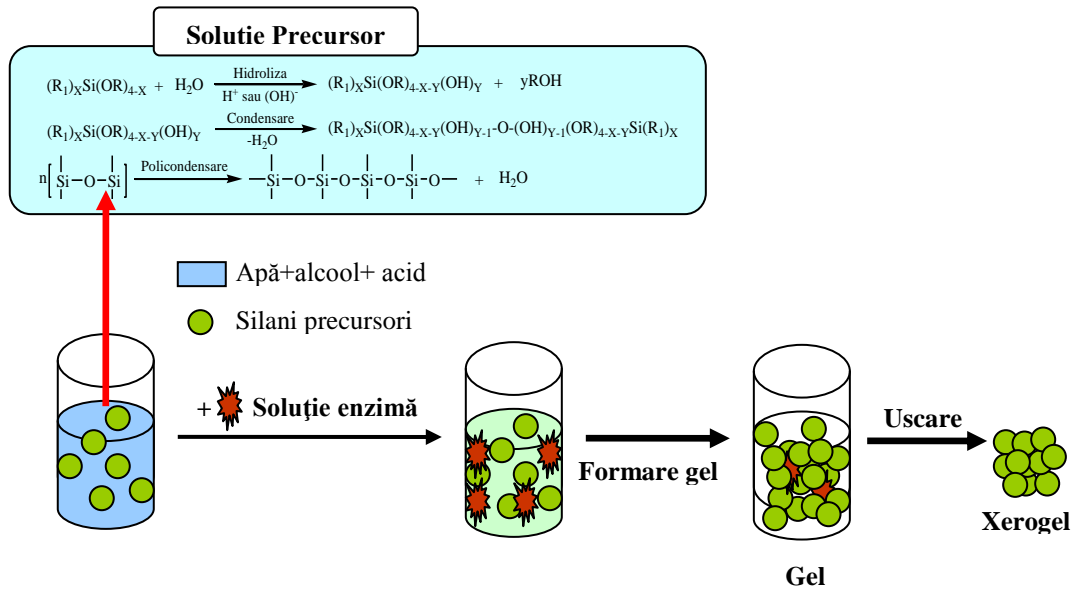


Figura I.14. Procesul de producere a xerogelului [38]

Modul în care proteina este entrapată, fizic sau/și prin legare adițională multiplă prin interacțiuni covalente, ionice sau hidrofobe între matrice și enzimă este încă neclar [38]. Figura I.15 prezintă schematic imaginea unei enzime entrapate în matrice silicice de gel.

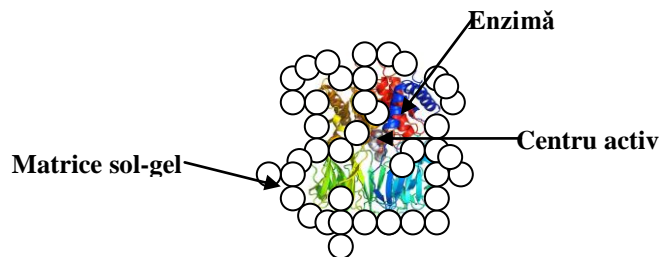


Figura I.15. Imagine schematică a unei enzime entrapate în sol-gel

Mecanismul formării gelului este unul complex și numai prima etapă a fost investigată din punct de vedere cinetic. A fost demonstrat că o modificare infimă a condițiilor experimentale (temperatură, natura solventului, concentrațiile folosite, natura catalizatorului, și factorii externi) modifică în mod drastic textura (aria suprafeței specifice, mărimea și distribuția porilor, densitatea, etc.) solidului obținut [38].

I.4.2. Imobilizarea celulelor. Stadiul actual al cercetării

Imobilizarea biomoleculilor în interiorul suporturilor insolubile reprezintă unul din scopurile importante în obținerea unor materiale funcționale diverse. Se cunosc diferite avantaje ale enzimelor imobilizate cum ar fi: creșterea stabilității, separarea ușoară din amestecul de reacție, posibilitatea de modelare a proprietăților catalitice și prevenirea infectării cu diferite microorganisme [38, 61]. Din nefericire, natura hidrofilică a complexului de celule reduce aplicabilitatea lor atunci când acestea sunt utilizate în reacții complexe [61]. Celulele care au fost imobilizate pe suporturi insolubile sunt capabile să hidrolizeze celuloza insolubilă, însă recuperarea acestor enzime este încă dificil de realizat [62]. Pentru a îmbunătăți proprietățile catalitice ale enzimelor s-au dezvoltat diferite metode de imobilizare cum ar fi imobilizarea prin adsorbție, legare covalentă sau entraparea în matrici polimerice anorganice sau organice [61].

Celuloza a fost imobilizată pe diferite suporturi dintre care se amintesc: geluri de alginat de calciu, polimeri de Eudragit™ L-100, membrane lipozomiale, membrane de polivinilalcool, minerale de tip argilă, diferite materiale lignocelulozice pretratate, membrane de colagen, spume poliuretanică, Duolite, Spherosil, Sepharose activată cu bromcian [63, 64]. O metoda simplă de imobilizare poate fi legarea covalentă a celulei pe diferite suporturi utilizând glutaraldehida ca agent de legare [65]. Mishra ș.a. au raportat, în 1983, imobilizarea prin legare covalentă a celulei din *Penicillium funiculosum* pe polivinilalcool (PVA) utilizând carbodiimida ca agent de înrețelare. În prezența carbodiimidei, randamentul de imobilizare, pentru toate preparatele obținute, a fost de peste 90%, comparativ cu randamentele de 30-40% obținute în absența carbodiimidei. Randamentul de hidroliză al celulozei din ierburile pretratate, calculat după 48 ore de reacție, a fost de 30% când s-a folosit celuloza nativă și a crescut la 59% când s-a folosit celuloza imobilizată. Celuloza imobilizată s-a reutilizat de 3 ori pe substrat de ierburi pretratate, fără să scadă randamentul de hidroliză [63]. Jones ș.a. au studiat imobilizarea celulei din *Trichoderma reesei* prin legare covalentă cu glutaraldehidă, utilizând un solvent organic pentru a precipita enzima legată covalent. Acetona a fost cel mai eficient precipitant iar concentrația de glutaraldehidă la care celuloza imobilizată a avut eficiență maximă în reacția de hidroliză a celulozei microcristaline, a fost de 5 mM. Celuloza imobilizată a fost reutilizată de cinci ori pe substrat de celuloză microcristalină, când activitatea a scăzut cu aproximativ 40% după al cincilea ciclu [65].

Imobilizarea celulei prin legare covalentă pe membrane lipozomiale, cu sau fără chitosan ca suport, utilizând glutaraldehida ca agent de legare, a fost studiată de Li ș.a. Celuloza imobilizată prin legare covalentă pe membrana lipozomială utilizând glutaraldehida ca agent de legare (eficiența catalitică a fost de 80%) a fost mai eficientă în hidroliza carboximetilcelulozei decât celuloza imobilizată prin legare covalentă pe membrana lipozomială cu chitosan și glutaraldehidă (eficiența catalitică a fost de 17%) și celuloza imobilizată simplu prin legare covalentă pe chitosan cu glutaraldehidă (eficiența catalitică a fost de 1,4%). Aceasta probabil se datorează faptului că enzima își pierde din activitate în timpul procesului sever de legare covalentă de chitosan. Folosirea chitosanului ca suport la imobilizare probabil împiedică accesul enzimei la substrat. Preparatele celulozice obținute prin imobilizare pe membrană lipozomială cu glutaraldehidă și chitosan ca suport, respectiv imobilizare prin legare covalentă pe chitosan cu glutaraldehidă s-au reutilizat de șase ori pe substrat solubil (carboximetilceluloză) și de cinci ori pe substrat insolubil (CC31). Activitatea relativă a celulei imobilizate prin legare

covalentă pe membrane lipozomiale cu chitosan și glutaraldehidă a fost mai mare decât activitatea enzimei imobilizate prin legare covalentă pe chitosan cu glutaraldehidă, la fiecare ciclu de utilizare. Unul dintre motivele pentru care celulaza imobilizată pe membrane lipozomiale a fost mai stabilă este că interacțiunea dintre enzimă și membrană împiedică inactivarea ei [66].

Dincer ș.a. au imobilizat celulaza din *Aspergillus niger* prin legare covalentă pe membrane de polivinilalcool (PVA) modificate cu anhidridă maleică, folosind chitosanul ca suport și epiclorhidrina ca agent de legare. Celulaza nativă a avut activitate catalitică maximă la pH 7.0, iar celulaza nativă la pH 4.0. Pentru ambele celule, celulaza nativă și imobilizată, temperatura optimă a fost atinsă la valoarea de 40°C. Celulaza imobilizată a fost mai stabilă decât celulaza nativă, în condițiile studiate. Celulaza imobilizată a fost reutilizată de cinci ori pe carboximetilceluloză, însă activitatea catalitică a scăzut cu 52% după al a cincea reutilizare [67].

Poli(2,6-dimetil-1,4-fenilenoxidul) (PPO), cu stabilitate termică bună, este unul dintre cei mai utilizați polimeri, iar forma bromurată (BPPO) prezintă și caracteristici bune de formare de membrane. S-a studiat imobilizarea celulei prin legare covalentă pe membrane schimbătoare de cationi construite prin aminarea și carboxilarea BPPO, folosind agentul de legare N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidă (EDC). Condițiile optime de imobilizare la care activitatea celulei imobilizate a fost maximă au fost: 40 mg/ml EDC, 20 h timp de activare, 25 h timp de imobilizare, 5 mg/ml celulază introdusă, pH 3,8. Activitatea celulei native a fost maximă la temperatura de 50°C. După imobilizare, valoarea temperaturii la care activitatea catalitică a fost maximă a crescut la 55°C. La temperaturi mai mari de 55°C, celulaza imobilizată a fost mai stabilă decât celulaza nativă [68].

În ultimii ani, datorită dimensiunii mici a particulelor, specificității ridicate de suprafață și toxicității scăzute, particulele nanomagnetice sunt aplicate în diferite domenii ca medicină sau industrie. Nanoparticulele de Fe₃O₄ sunt cele mai folosite materiale magnetice biocompatibile cu toxicitate scăzută și proprietăți magnetice puternice, având aplicații în adsorbția intracelulară și separare, ambalarea medicamentelor, rezonanța magnetică, imobilizarea proteinelor și enzimelor, purificarea proteinelor și tratarea apelor [61].

Legarea covalentă a celulei de nanoparticule magnetice de oxid de fier folosind carbodiimida ca agent de activare a fost studiată de Jordan ș.a. La o cantitate de celulază de 1-2 mg, s-a atins randamentul maxim de imobilizare de aproximativ 90%. Celulaza imobilizată a fost mai stabilă termic decât celulaza nativă. La temperatura de 50°C, activitatea ambelor celule, nativă și imobilizată, a fost optimă. Activitatea celulei native a fost maximă la pH 4.0. După imobilizare, valoarea pH-ului la care activitatea catalitică a fost maximă a crescut la 5,0. Celulaza imobilizată s-a reutilizat de șase ori pe substrat de celuloză microcristalină [61].

Darias ș.a. au studiat imobilizarea celulei din *Trichoderma viride* prin legare covalentă de chitosan. După imobilizare, celulaza a pierdut 60% din activitatea inițială, aceasta probabil datorându-se inactivării enzimei în timpul legării de chitosan. După imobilizare, pH-ul la care activitatea catalitică a fost maximă, a rămas același (5.0). Ambele celule, nativă și imobilizată, au avut activitate optimă la temperatura de 58°C, însă stabilitatea termică a celulei a crescut în urma imobilizării [69]. Celulaza din *Aspergillus niger* s-a imobilizat prin legare covalentă de chitosan-acid glutamic și chitosan-acid 4-aminobutiric, respectiv prin înrețelarea (reticularea) enzimei pe chitosan-acid glutamic și chitosan-acid 4-aminobutiric cu glutaraldehidă (GDA). După imobilizarea celulei prin legare covalentă, randamentul de regăsire al activității a fost de 58% pentru celulaza imobilizată pe

chitosan, 76% pentru celuloza imobilizată pe chitosan-acid glutamic, respectiv 55% pentru celuloza imobilizată pe chitosan-acid 4-aminobutiric. După imobilizarea celulozei prin înrețelare cu GDA, randamentul de regăsire al activității a fost de 65% pentru celuloza imobilizată pe chitosan-GDA, 85% pentru celuloza imobilizată pe chitosan-acid glutamic-GDA, respectiv 63% pentru celuloza imobilizată pe chitosan-acid 4-aminobutiric-GDA. Metoda de imobilizare prin înrețelare s-a dovedit a fi mai eficientă decât metoda de imobilizare prin legare covalentă. Toate cele trei preparate obținute în urma imobilizării prin înrețelare au fost mai stabile decât celuloza nativă, în condițiile studiate (pH, temperatură și stabilitate la depozitare timp de 100 zile). După imobilizarea celulozei pe chitosan-DGA, respectiv pe chitosan-acid 4-aminobutiric-GDA, temperatura la care activitatea celulozei a fost maximă nu s-a modificat (50°C), comparativ cu celuloza nativă, însă a crescut la 60°C după imobilizarea prin înrețelare a celulozei pe chitosan-acid glutamic-DGA. S-a observat că celuloza imobilizată prin înrețelare pe chitosan-GDA a reținut aproximativ 60% din activitatea inițială, după 6 cicluri de utilizare, în reacția de hidroliză a carboximetilcelulozei. Celuloza imobilizată prin înrețelare pe chitosan-acid glutamic-GDA și chitosan-acid 4-aminobutiric-GDA a reținut aproximativ 50% din activitatea inițială, după 25 cicluri de utilizare [70].

Dintre tehnicile de imobilizare cunoscute, imobilizarea prin adsorbție poate fi o metoda avantajoasă datorită costurilor scăzute, simplității metodei și eficienței catalitice obținute [38]. Ogeda ș.a. au studiat imobilizarea celulozei din *Trichoderma reesei* prin adsorbție pe Si/SiO₂. După imobilizare, preparatul celulozic obținut s-a testat în reacția de hidroliză a celulozei Avicel netratată și pretratăată cu acid fosforic, respectiv celulozei din bumbac și eucalipt. Celuloza imobilizată prin adsorbție a determinat obținerea unor randamente de hidroliză mai mici în cazul suporturilor netratate (Avicel, celuloza din bumbac și celuloza din eucalipt), comparativ cu celuloza nativă, aceasta datorându-se fenomenului de difuziune îngreunată a enzimei la substrat după imobilizare. Însă în urma pretratăării celulozei Avicel cu acid fosforic, randamentul de hidroliză obținut cu celuloza imobilizată a fost mai mare decât în cazul enzimei native, acesta probabil se datorează faptului că grupările fosfat în celuloză inactivează mai repede celuloza nativă. Preparatul enzimatic s-a reutilizat de șase ori, iar activitatea catalitică a scăzut cu aproximativ 20% după al șaselea ciclu de utilizare [71].

Cele mai multe studii au demonstrat că enzimele imobilizate pe suporturi anorganice prezintă stabilitate mai ridicată decât preparatele obținute utilizând suporturi organice. Carbonele activ prezintă o suprafață foarte mare (600-1000 m²/g, volumul porilor de 300-1000 Å), acesta dovedindu-se un suport eficient pentru imobilizare. S-a studiat imobilizarea celulozei din *Aspergillus niger* prin adsorbție pe cărbune activ. A fost investigat efectul parametrilor de imobilizare (timpul, temperatura și concentrația de celuloză introdusă) asupra capacității de adsorbție. Timpul la care capacitatea de adsorbție a fost optimă a fost de 40 minute (la o concentrație de celuloză de 5 mg/ml, pe intervalul de temperatură de 20-60°C). Capacitatea de adsorbție a celulozei a crescut odată cu creșterea temperaturii (domeniul de temperatură studiat a fost 20-60°C). La 30°C, capacitatea de adsorbție a fost de 92% pentru o concentrație de 2 mg/ml celuloză introdusă. Parametrii termodinamici studiați (ΔG^0 , ΔH^0 , ΔS^0) au arătat că procesul de adsorbție pe cărbune este spontan și endoterm. Celuloza imobilizată s-a reutilizat de 5 ori pe substrat de metilceluloză, însă activitatea catalitică a scăzut cu 30% după prima reutilizare, după care s-a menținut constantă [64]. Jabasingh ș.a. au studiat imobilizarea celulozei din *Aspergillus nidulans* prin adsorbție pe cărbune activ modificat cu H₂O₂. Randamentul de imobilizare a crescut până la 2 ore de adsorbție,

indiferent de cantitatea de enzimă introdusă (4-16 mg/ml). La 2 ore de adsorbție, randamentul de imobilizare la 4 mg/ml enzimă introdusă a fost de 79,5%, și a scăzut adată cu creșterea cantității de celulază. Parametrii termodinamici studiați (ΔG^0 , ΔH^0 , ΔS^0) au demonstrat, de asemenea, că procesul este spontan, endoterm și ireversibil. Celulaza imobilizată prin adsorbție pe cărbune activ modificat s-a reutilizat de 10 ori pe substrat de carboximetilceluloză, fără să se observe scăderi de activitate [72].

Chang ș.a. au studiat imobilizarea celulei din *Trichoderma reesei* prin adsorbție pe nanoparticule de silice mezoporoasă (MSN) cu dimensiunea porilor mică (circa 150 nm) utilizând ca silan tetraetoxisilan (SPMSN) și pe nanoparticule de silice mezoporoasă cu dimensiunea porilor mare (circa 600 nm) utilizând ca silan 3-aminopropil-trimetoxisilan (LPMSN). S-a investigat imobilizarea enzimei prin legare covalentă de LPMSN cu tetraetoxisilan și (3-trietoxisililpropil)-acid succinic (TESP-SA), hidroclorură de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimidă și *N*-hidroxisuccinimidă. Sarcinile electrice ale suprafeței au influențat randamentul de imobilizare al celulei. Deoarece sarcinile electrice ale celulei, SPMSN și suportul utilizat pentru legarea covalentă, LPMSN cu TESP-SA în tampon pH 4,8 au fost negative (-6,8 mV), (-14,8 mV), respectiv (-40,5 mV), interacțiunile electrostatice dintre enzimă și substrat sunt mai slabe. Deoarece sarcinile electrice ale LPMSN sunt aproximativ 0 (+ 1,0 mV) datorită existenței grupărilor Si-OH și Si-NH₂ celulaza a fost adsorbită mai eficient pe acest substrat datorită interacțiunilor celulei cu gruparea Si-NH₂. Cantitatea de glucoză eliberată în timpul reacției de hidroliză a celulozei pretratate cu [Bmim]Cl catalizată de celulaza adsorbită pe SPMSN, LPMSN și TESP-SA LPMSN a fost 33,30%, 77,89%, respectiv 83,78%, însă mai mică decât cantitatea de glucoză obținută în urma reacției catalizate de celulaza nativă (85%).

Celulaza imobilizată prin legare covalentă de LPMSN cu TESP-SA a fost mai eficientă decât celulaza imobilizată prin adsorbție simplă. Unul din avantajele celulei imobilizate a fost creșterea stabilității la depozitare la temperatura camerei. După 23 de zile, celulaza imobilizată a pierdut 4,6% din activitate, iar celulaza nativă a pierdut 37,8% din activitatea inițială [73]. Lupoi ș.a. au observat că celulaza din *Trichoderma viride* imobilizată prin adsorbție pe silice Aerosil-OX (diametrul particulelor 40 nm, aria totală a suprafeței 1,4 m²) este mai stabilă decât celulaza nativă în condițiile de reacție studiate. După 96 ore de zaharificare și fermentare simultană a celulozei, celulaza imobilizată a produs de 1,6 ori mai multă glucoză decât celulaza nativă. Prin urmare, în urma imobilizării celulei, a crescut cantitatea de etanol formată în timpul procesului de zaharificare și fermentare simultană. Cantitatea de etanol obținută, după 96 ore de reacție, a fost de 10,9 mg, când s-a folosit celulaza imobilizată, respectiv de 3,8 mg, când s-a folosit celulaza nativă. Celulaza imobilizată s-a reutilizat de trei ori, iar cantitatea de glucoză produsă la al doilea și al treilea ciclu de utilizare a scăzut la 17% [74].

Hartono ș.a. au studiat imobilizarea celulei prin adsorbție pe matrice de silice FDU-12 mezoporoasă (PS) formată cu tetraetoxisilan (TEOS), respectiv pe matrice de silice FDU-12 funcționalizate, preparate prin amestecul a doi silani. Formarea matricii de silice funcționalizată s-a realizat prin amestecarea silanului TEOS cu diferiți organosilani (în raport molar 15:1), surfactantul Pluronic F-127 și trimetilbenzen (TMB). Organosilanii utilizați în acest studiu au fost: 3-aminopropiltriethoxisilan APTES (denumirea matriciei formate cu acest silan este S-APTES), 3-mercaptopropiltrimetoxisilan MPTMS (denumirea matriciei formate cu acest silan este S-MPTMS), viniltrimetoxisilan VTMS (denumirea matriciei formate cu acest silan este S-VTMS), feniltrimetoxisilan PTMS (denumirea matriciei formate cu acest silan este S-PTMS). Capacitatea de adsorbție a celulei pe S-APTES, respectiv

pe S-VTMS a fost aproximativ aceeași, indiferent de concentrația de celulază adăugată. La o concentrație de 0,8 mg/ml enzimă adăugată, s-a adsorbit aproximativ 16,12 mg celulază/g S-APTES și 17,05 mg celulază/g S-VTMS. Comparativ cu substraturile funcționalizate (S-APTES, S-VTMS), pe matricea de silice mezoporoasă (PS) s-a adsorbit o cantitate mai mică de enzimă, indiferent de cantitatea de celulază adăugată (la o concentrație de 0,8 mg/ml celulază, pe PS s-a adsorbit 8,55 mg celulază/g silice). Chiar dacă capacitatea de adsorbție a celulei pe S-APTES a fost mai ridicată (16,12 mg celulază/g S-APTES) comparativ cu PS, după imobilizarea celulei pe S-APTES a scăzut semnificativ activitatea catalitică, de la 14,00 U/mg enzimă la 1,10 U/mg enzimă. După imobilizarea celulei pe S-VTMS, respectiv pe PS, activitatea catalitică a scăzut la 71% din activitatea celulei native (capacitatea de adsorbție a celulei a fost de 8,55 mg celulază/g PS), respectiv la 78% (capacitatea de adsorbție a celulei a fost de 17,05 mg celulază/g S-VTMS). S-a studiat stabilitatea operațională a celulei imobilizate pe PS, S-APTES și S-VTMS. După 14 zile de operare, celula imobilizată pe PS a pierdut 65-70% din activitatea inițială, în timp ce celula imobilizată pe S-APTES și S-VTMS a pierdut 78-100%, respectiv 71-90% din activitatea inițială. Imobilizarea celulei pe matrice de silice funcționalizată a determinat creșterea stabilității operaționale a celulei [75].

Entraparea celulei în matrice polimerice anorganice sau organice poate fi considerată o metodă avantajoasă de imobilizare datorită numeroaselor avantaje pe care le prezintă: uniformitate, biocompatibilitate, stabilitate termică și chimică ridicată, posibilitatea de a imobiliza o cantitate mare de proteină, această metodă putând fi aplicată unui domeniu larg de proteine [38, 76, 77].

Unele din cele mai bune nanomateriale sunt aerogelurile, care pot fi obținute prin uscarea supercritică cu dioxid de carbon a gelului. Aerogelul este un material cu proprietăți unice cum ar fi porozitate ridicată, densitate scăzută, suprafață specifică bună și conductivitate termică scăzută, fiind un material inert și netoxic. Procesul de imobilizare a celulei într-o matrice de sol-gel poate implica două etape: entraparea celulei în matricea de sol-gel și uscarea supercritică cu dioxid de carbon. Celula din *Humicola insolens* a fost imobilizată prin metoda sol-gel folosind ca silan precursor tetrametoxisilan, urmată de uscare supercritică a gelului folosind dioxid de carbon. În urma imobilizării, stabilitatea termică a celulei a crescut. Celula imobilizată a avut activitatea catalitică optimă la temperatura de 40°C, iar celula nativă la 30°C. S-a studiat reutilizarea celulei imobilizate la presiune atmosferică și în mediu de CO₂/H₂O și 10 MPa, folosind ca substrat carboximetilceluloza. S-a observat că celula imobilizată a putut fi reutilizată de 15 ori la presiune atmosferică și de 20 ori în mediu de CO₂/H₂O [78]. Entraparea celulei din *Bacillus subtilis* în alginat de calciu a fost studiată de Andriani ș.a. În urma entrapării enzimei, valoarea temperaturii optime a crescut de la 50°C (în cazul celulei native) la 60°C, însă activitatea relativă a celulei imobilizate a scăzut la 45% după al treia reutilizare pe carboximetilceluloză ca substrat [79].

Celula imobilizată prin încapsulare într-o matrice mezoporoasă de silice SBA-15, de diferite dimensiuni (5,4 nm, 8,9 nm și 11 nm) a fost studiată de Takimoto ș.a. Cantitatea de enzimă imobilizată a crescut odată cu mărimea porilor SBA-15. Cantitatea maximă de celulază încapsulată a fost de 8,3 mg/10 mg SBA-15 de 11 nm, de 8,2 mg/10 mg SBA-15 de 8,9 nm, de 7 mg/10 mg SBA-15 de 5,4 nm și de 4 mg/10 mg silice amorfă. Activitatea celulei imobilizate pe SBA-15 de 8,9 nm a fost cu 70% mai mică decât activitatea celulei native [80].

Se poate afirma că cercetările privind imobilizarea celulelor prin entrapare în sol-gel se găsesc încă în faza de început și pe plan mondial, existând vaste posibilități de investigare în acest domeniu.

I.5. Conversia biomasei la bioetanol

Obținerea biocombustibililor implică utilizarea unor materii prime regenerabile cum ar fi: tulpini de grâu și porumb, lemn, biomasă cultivată (de exemplu, genul *Miscanthus*) sau diverse deșeuri [9, 81, 82].

Se cunosc cel puțin **două metode** de preparare a etanolului din materiale lignocelulozice:

a) Celuloliza: constă în hidroliza materialelor lignocelulozice pretratate, urmată de fermentare și distilare [83, 84];

b) Gazeificarea: în care biomasa lignocelulozică este transformată în monoxid de carbon și hidrogen, prin fermentare sau prin cataliză termochimică, aceste gaze fiind apoi convertite la bioetanol [83, 84, 85].

Prin niciuna dintre procedurile de obținere a bioetanolului celulozic nu se generează emisii toxice, iar utilizarea sa drept combustibil conduce la o diminuare a emisiilor de gaze cu efect de seră cu aproximativ 80%, însă dezavantajul major îl reprezintă costurile mai ridicate comparativ cu bioetanolul obținut din amidon.

Natura biomasei lignocelulozice influențează procesul de hidroliză a polizaharidelor, procesele tehnologice de obținere a etanolului celulozic fiind diferite, în funcție de metodele de hidroliză și fermentare utilizate [86].

Celuloza și hemiceluloza sunt două polizaharide din compoziția biomasei care pot fi scindate în zaharuri fermentescibile. Lignina, neavând în compoziția sa zaharuri, nu poate fi folosită la prepararea bioetanolului. În timpul procesului, datorită structurii și conținutului lor diferit, celuloza și hemiceluloza sunt procesate separat. Datorită structurii amorfe, hemiceluloza poate fi ușor hidrolizată în prezență de acizi diluați sau baze, sau sub acțiunea unui număr mare de enzime cum ar fi hemicelulazele [87].

Metoda celulolitică de obținere a bioetanolului cuprinde cinci etape principale [88, 89]:

- Pretratarea biomasei lignocelulozice
- Hidroliza celulozei
- Separarea soluției de zaharuri fermentescibile de materialul rezidual
- Fermentarea microbiană a soluției de zaharuri
- Distilarea alcoolului.

Reprezentarea schematică a metodei celulolitice de obținere a etanolului celulozic este prezentată în Figura I.16 [90].

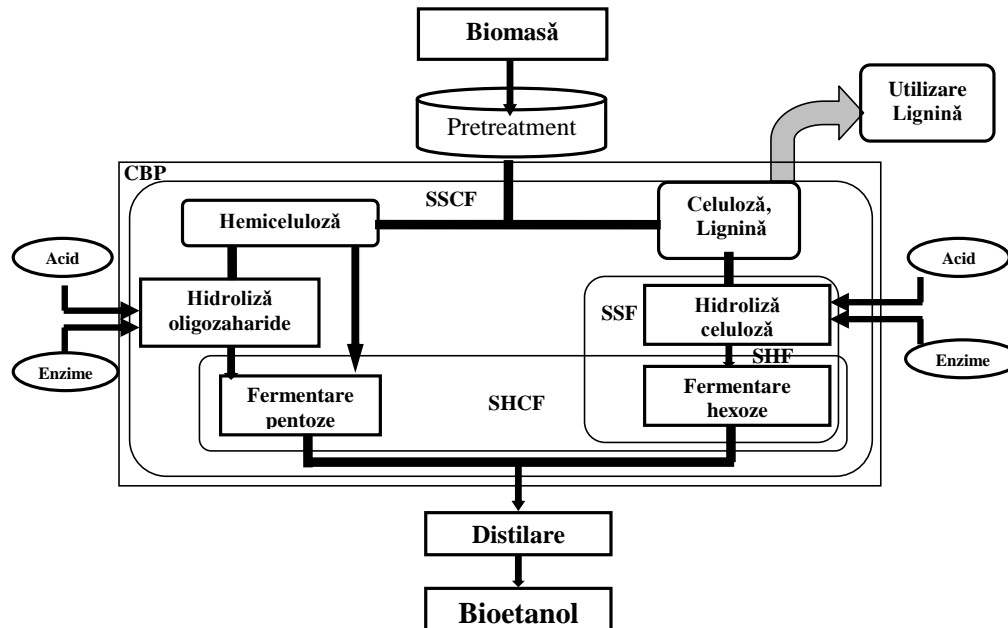


Figura I.16. Conversia biomasei lignocelulozice la bioetanol [90]

Producerea bioetanolului se poate urmări pe mai multe căi (Figura I.16) [90]:

- *Hidroliza și fermentația separată (SHF)*: în care are loc hidroliza celulozei urmată de fermentația zaharurilor
- *Hidroliza și co-fermentația separată (SHCF)*: în care are loc hidroliza celulozei și hemicelulozei urmată de fermentația simultană a hexozelor și pentozelor rezultate
- *Hidroliza și fermentația simultană (SSF)*: în care hidroliza celulozei și fermentația hexozelor are loc simultan
- *Hidroliza și co-fermentația simultană (SSCF)*: în care hidroliza celulozei și hemicelulozei și fermentația hexozelor și pentozelor are loc simultan
- *Procesul consolidat de biotransformare*: producerea enzimelor, hidroliza și fermentația au loc într-o singură etapă

I.5.1. Pretratarea biomasei lignocelulozice

Prima etapă în bioconversia lignocelulozei la bioetanol este pretratarea biomasei. Scopul principal al pretratamentului este de a distruge obstacolele structurale și de compoziție ce pot influența negativ procesul de hidroliză, precum și de a îmbunătăți accesul enzimei la celuloză și de a mări randamentul de obținere a zaharurilor fermentescibile din celuloză sau hemiceluloză [90, 91, 92]. În etapa de pretratament este necesar să se urmărească atingerea următoarelor cerințe:

- îmbunătățirea formării zaharurilor fermentescibile;
- evitarea degradării sau pierderii carbohidraților;
- evitarea formării produșilor secundari ce pot inhiba enzima și procesele de fermentare;
- reducerea costurilor [93, 94];

I.5.2. Metode de pretratare a biomasei lignocelulozice

La ora actuală se cunosc câteva procedee de pretratare a materialului lignocelulozic:

- A. Procedee fizice:** presiune, tocare, mărunțire, măcinare, agitare, compresie sau alte tipuri de procedee mecanice.
- B. Procedee chimice** (acizi, medii alcaline,) [90, 91, 93, 94, 95]
- C. Procedee fizico-chimice** (amoniac, aburi, dioxid de carbon, solvenți organici etc.) [91]

I.5.2.1. Procedee fizice de pretratare

Procedeele fizice de pretratare presupun transformarea biomasei într-o pulbere fină, prin mărunțire, măcinare, tocare, pentru facilitarea tratamentelor chimice și biologice ulterioare. De exemplu, prin tocare se obțin particule de dimensiunea 10-30 nm, iar prin măcinare sau marunțire se obțin particule de aproximativ 0,2-2 nm.

În funcție de natura materiei prime, metoda de pretratare este diferită, minimalizându-se astfel degradarea substratului și fiind totodată îmbunătățit randamentul de hidroliză. Cu cât biomasa este mai bine mărunțită cu atât accesul polizaharidelor în situsul catalitic al enzimelor este facilitat. Dimensiunea ideală de mărunțire variază de la câțiva centimetri până la 1-3 mm. Energia consumată pentru reducerea dimensiunii particulelor reprezintă aproximativ 30% din consumul energetic total al procesului [90]. Această metodă determină creșterea ariei suprafeței specifice și reduce gradul de polimerizare. Deoarece costurile energetice sunt ridicate, această metodă nu este avantajoasă din punct de vedere economic [90].

Metoda de iradiere a celulozei cu raze γ determină mărirea ariei suprafeței și scăderea gradului de cristalinitate al celulozei prin ruperea legăturilor de hidrogen [96].

I.5.2.2. Procedee chimice de pretratare

Deoarece biomasa lignocelulozică este extrem de recalcitrantă la degradare, s-au dezvoltat o serie de metode de pretratare chimică. Studiile efectuate au demonstrat că există o corelație directă între îndepărtarea ligninei sau hemicelulozei și creșterea randamentului de hidroliză [90, 95]. Metodele termochimice de pretratare implică scindarea fibrelor biomasei în diferite condiții acide sau alcaline, la temperaturi ridicate, fără a fi afectați constituenții biomasei [90].

I.5.2.2.1. Hidroliza acidă

Hidroliza acidă a fost folosită mult timp, însă are efecte negative asupra mediului înconjurător, prin depozitarea deșeurilor de gips. Pentru pretratarea biomasei se poate folosi acid sulfuric sau clorhidric. În general, etapa de hidroliză chimică a biomasei lignocelulozice are loc printr-un atac acid. Această metodă a fost folosită mult timp, însă are efecte negative asupra mediului înconjurător [90, 94, 96].

Hidroliza cu acid sulfuric diluat

Dintre toate metodele chimice de pretratare, metoda cu acidul sulfuric diluat la temperatură ridicată are cele mai multe aplicații industriale, deoarece se obține o cantitate mare de zaharuri fermentescibile din hemiceluloză [93, 95].

Se cunosc două tipuri de pretratamente cu acid diluat: la concentrații scăzute de acid (5-10%) și temperaturi ridicate (>433 K), la concentrații mai mari de acid (10-40%) și temperaturi scăzute (<433 K) [93]. Timpul de reacție este relativ scurt, de la câteva minute la câteva ore. Pretratarea materialului lignocelulozic cu acid sulfuric diluat poate avea loc în două etape. Într-o primă etapă are loc depolimerizarea hemicelulozei la xiloză și alte zaharide, iar în etapa a doua are loc hidroliza celulozei.

Temperatura de lucru ridicată poate produce degradarea polizaharidelor, fiind posibilă însă și degradarea monozaharidelor obținute. O creștere a randamentului de reacție este posibilă în cazul în care procesul se desfășoară în reactoare cu amestecare, iar colectarea monozaharidelor se face imediat după obținere.

Realizarea hidrolizei în două etape reprezintă o altă variantă prin care se poate mări randamentul de obținere a zaharurilor fermentescibile. Prima etapă are loc în condiții mai blânde, pentru recuperarea pentozelor, iar cea de-a doua etapă se desfășoară în condiții mai severe, pentru a permite recuperarea hexozelor. Avantajul acestui tip de pretratare îl constituie viteza mare de reacție. În funcție de natura biomasei, în urma pretratării cu acid diluat aproximativ 70-95% din hemiceluloză poate fi hidrolizată la zaharuri. Avantajele pretratării cu acid diluat sunt: are loc hidroliza mai rapidă a hemicelulozei, comparativ cu alte metode de hidroliză (enzimatică), în funcție de condițiile de hidroliză se poate evita degradarea zaharurilor.

Dezavantajele metodei de hidroliză acidă sunt: necesitatea folosirii unor materiale speciale, scumpe, pentru construcția reactorului și dificultatea de recuperare a zaharurilor, datorită apariției unei reacții secundare de degradare a glucidelor [90, 93]. Figura I.18 prezintă schema hidrolizei biomasei cu acid diluat.

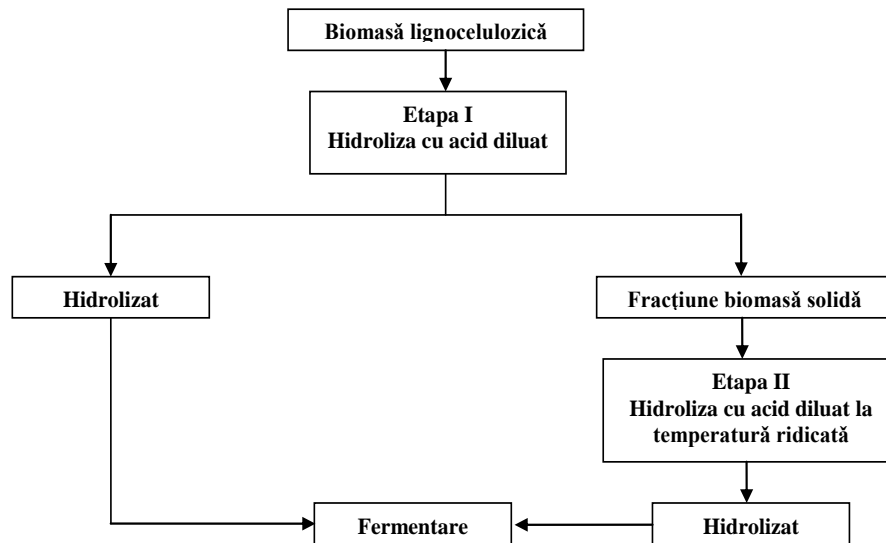


Figura I.17. Reprezentarea schematică a hidrolizei biomasei cu acid diluat

Hidroliza cu acid concentrat

În metoda de pretratare cu acizi concentrați se lucrează cu H_2SO_4 72% sau HCl 42%, la 25°C pentru dizolvarea celulozei, urmată de diluția cu acid 1% și încălzirea amestecului la $100\text{-}120^\circ\text{C}$ 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: acizii concentrați sunt toxici, reactoarele trebuie construite din materiale speciale, consum de apă mare, costuri ridicate [93, 96].

Se lucrează cu acid clorhidric concentrat, în condiții blânde de temperatură și presiune. Într-o primă etapă, are loc îndepărtarea hemicelulozei din lignoceluloză cu acid de 35%, iar hidroliza propriu-zisă se desfășoară în prezența acidului mai concentrat. Această metodă determină degradarea lentă a polizaharidelor, se desfășoară cu o viteză relativ scăzută, însă are o eficiență ridicată (peste 90%) și este mai ieftină. Ea prezintă și dezavantaje legate de necesitatea recuperării sau neutralizării acidului din soluția de zaharuri, precum și necesitatea utilizării unor instalații speciale anticorozive [93, 96].

Atunci când biomasa lignocelulozică este tratată cu acid sulfuric, se formează și compuși toxici nedorți cum sunt furfuralul și hidroximetil furfuralul, care au efect inhibitor asupra etapelor ulterioare de hidroliză și fermentație a zaharurilor [91]. Eliminarea acestor inhibitori necesită etape suplimentare, care influențează costurile de producție [90, 91, 93]. Figura I.19 prezintă schema hidrolizei biomasei cu acid concentrat.

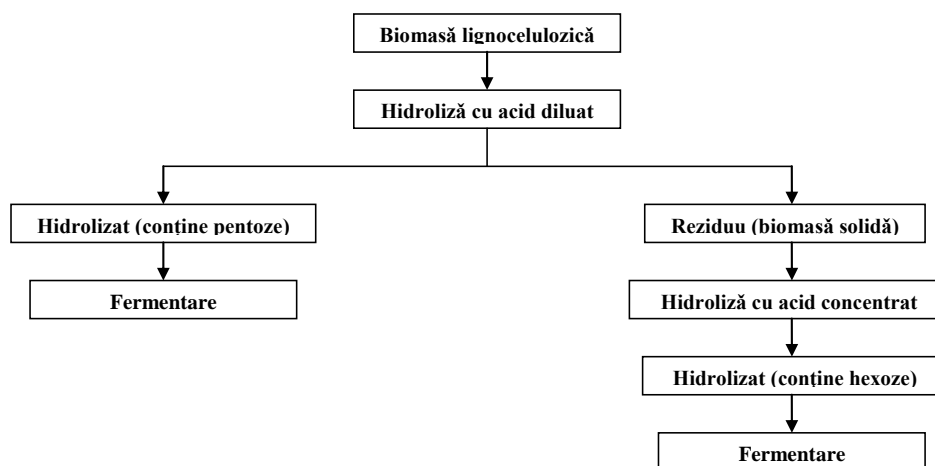


Figura I.18. Reprezentarea schematică a hidrolizei biomasei cu acid concentrat

I.5.2.2.2. Pretratarea biomasei cu hidroxizi

Această metodă de pretratare folosește baze de tipul hidroxidului de sodiu, hidroxidului de amoniu sau hidroxidului de calciu [93, 96]. Cel mai eficient agent de pretratare s-a dovedit a fi hidroxidul de calciu. Acest agent se poate recupera ușor din sistemul apos prin neutralizare. 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. Procesul se poate desfășura la temperaturi și presiuni scăzute, însă timpul de pretratare poate varia de la ore la zile în funcție de condițiile de reacție [95, 96]. Avantajele majore ale acestui tip de pretratament sunt: crește reactivitatea celulozei, se degradează o cantitate mică de zahar, iar costurile pentru materiile prime sunt mult mai scăzute, comparativ cu hidroliza acidă. Utilizarea unor concentrații mari de reactivi necesită tratarea apelor reziduale și duce la creșterea costurilor pentru neutralizarea deșeurilor [90, 96].

Pretratamentul cu hidroxid de calciu presupune amestecarea apei cu hidroxidul de calciu, adăugarea biomasei (particulele biomasei trebuie să fie mai mici de 10 nm), și păstrarea soluției timp de câteva ore sau zile, în funcție de temperatura de pretratare [96]. Pretratamentul cu hidroxid de calciu îndepărtează lignina și hemiceluloza din biomasă, însă determină creșterea indicelui de cristalinitate al celulozei. Deoarece în timpul pretratării biomasei cu oxid de calciu are loc acetilarea și creșterea cristalinității celulozei, această metodă de pretratare nu este eficientă pentru hidroliza enzimatică [93]. Condițiile optime de pretratare a paielor de porumb cu hidroxid de calciu, astfel încât randamentul de hidroliză să se apropie de 100%, au fost: 0,0075 g hidroxid de calciu/g biomasă uscată, 5 g apă/ g biomasă uscată, 4 ore la 120°C [96].

Pretratarea biomasei cu soluție diluată de hidroxid de sodiu a determinat creșterea ariei suprafeței specifice, scăderea gradului de polimerizare, scăderea cristalinității celulozei, ruperea legăturilor dintre lignină și carbohidrați și modificarea structurii ligninei [96]. Pretratarea biomasei cu hidroxid de amoniu a determinat îndepărtarea ligninei. În urma pretratării știuleților de porumb și ierburilor cu 2,5-

20% hidroxid de amoniu, timp de 1 oră, la 170⁰C, s-a îndepărtat aproximativ 60-80%, respectiv 65-85% lignină [95].

I.5.2.3. Metode fizico-chimice de pretratare

I.5.2.3.1. Expandarea cu aburi

Expandarea cu aburi este una din cele mai avantajoase metode de pretratare a biomasei putând fi considerată o alternativă a metodelor chimice sau mecanice de pretratare. Se lucrează la temperaturi și presiuni ridicate, în recipiente închise etanș [95]. Materialul lignocelulozic este încălzit cu ajutorul aburilor sub presiune. După un interval de câteva minute se formează aburi, care la decompresie determină expandarea materialului lignocelulozic [90].

Efectele pretratamentului cu aburi asupra biomasei lignocelulozice sunt:

- Pretratarea cu aburi determină creșterea gradului de cristalinitate al celulozei
- Hidroliza rapidă a hemicelulozei
- Delignifierea biomasei

În comparație cu pretratarea mecanică, unul din avantajele pretratării cu aburi îl reprezintă costurile energetice mai reduse (cu 70%). Această metodă este considerată eficientă pentru pretratarea lemnului de esență tare și reziduurilor agricole. La temperaturi ridicate, apa poate avea proprietățile unui acid, ceea ce poate determina hidroliza hemicelulozei și degradarea zaharurilor [90, 94].

I.5.2.3.2. Pretratarea biomasei cu amoniac

Pretratarea biomasei cu amoniac este un proces fizico-chimic care presupune amestecarea materialului lignocelulozic de umiditate 15-30%, cu 1-2 Kg amoniac lichid/ Kg biomasă, la presiunea de 12 atm [90, 96]. Schema aparatului de pretratare a biomasei cu amoniac, în laborator, este prezentată în Figura I.19 [96]. În timpul pretratării doar o mică parte din materialul lignocelulozic este solubilizat. Hemiceluloza a fost degradată la oligomeri ai zaharurilor și lignina a fost îndepărtată. În urma hidrolizei ierburilor de Bermuda (*Cynodon dactylon*, conțin aproximativ 5% lignină) și paielor (conțin aproximativ 15% lignină) pretratate cu amoniac, randamentul de hidroliză a fost de peste 90%. Pretratamentul cu amoniac nu este eficient pentru biomasa care are conținut ridicat de lignină. De exemplu, randamentul obținut în urma hidrolizei plopului pretratată (conține 25% lignină), a fost de numai 50% [93, 96].

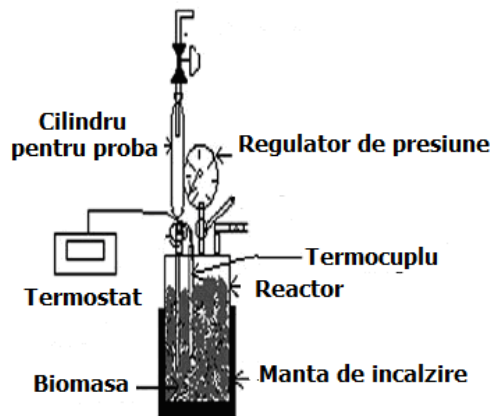


Figura I.19. Schema de pretratare a biomasei cu amoniac, în laborator [96]

Condițiile optime de pretratare a paielor de porumb cu amoniac, care au dus la un randament de hidroliză de peste 98%, au fost: raport molar amoniac/biomasă de 1:1, umiditatea biomasei de 60%, 5 minute și temperatura de 90°C [96]. Pretratarea cu amoniac reduce conținutul de lignină din biomasă, degradează hemiceluloza la oligomeri și determină scăderea cristalinității celulozei [96]. Această metodă este scumpă datorită costului ridicat al amoniacului, de aceea utilizarea sa viitoare este condiționată de recuperarea amoniacului [90, 93].

I.5.2.3.3. Pretratarea biomasei cu dioxid de carbon

Pretratamentul cu CO₂ supercritic este un proces similar cu pretratamentul cu amoniac sau cu aburi. Datorită formării de acid carbonic (în prezența apei), în timpul pretratării randamentul de hidroliză crește [90, 96]. Dacă se lucrează cu temperaturi scăzute, se poate evita degradarea monozaharidelor de către acid [96]. Creșterea presiunii facilitează accesul moleculelor de CO₂ în structura cristalină, astfel crește cantitatea de glucoză. Prin hidroliza lucernei pretratate cu CO₂ (4 Kg CO₂/Kg biomasă, 5,62 MPa) după 24 ore de reacție randamentul de hidroliză a fost de 75% [96]. Prin această metodă de pretratare se obțin randamente de hidroliză mai mici decât prin pretratarea cu amoniac sau cu aburi, însă costurile de proces sunt mai mici și nu se formează compuși inhibitori [90, 96].

I.5.2.3.4. Pretratarea biomasei cu solvenți organici

Pretratarea biomasei cu solvenți organici presupune utilizarea unor solvenți sau a unui amestec de solvenți, cu sau fără prezența catalizatorilor (acid clorhidric, acid sulfuric, acid oxalic sau acid salicilic). Procesul are loc la temperaturi ridicate (100-250°C) în prezența diferitor solvenți (etanol, metanol, etilenglicol, glicerină, eteri, cetone, fenoli, dimetilsulfoxid etc.). Alcolii folosiți la pretratare pot îndepărta lignina din biomasă și solubiliza hemiceluloza prin: scindarea legăturilor din lignină, scindarea legăturilor eterice și esterice dintre lignină și hemiceluloză, și ruperea legăturilor glicozidice din celuloză [91].

Unii dintre solvenți pot fi recuperați prin evaporare sau condensare, astfel scăzând costurile procesului [91].

Utilizarea procedurii cu solvenți prezintă unele avantaje comparativ cu metoda acidă sau alcalină de pretratare [91]:

- este o metodă selectivă de pretratare, permițând separarea fracțiunilor (lignina uscată, fracțiunea celulozică și soluția apoasă care conține zaharuri fermentescibile din hemiceluloză sau celuloză)
- procedeul cu solvenți poate fi combinat cu alte metode de pretratare determinând creșterea randamentului de hidroliză
- unii solvenți organici pot fi recirculați, astfel scad costurile procesului
- este una din metodele de pretratare care nu necesită neapărat mărunțirea biomasei pentru o conversie a celulozei mai bună

Metoda de pretratare care folosește ca solvent etanolul implică scindarea chimică și solubilizarea fragmentelor de lignină. Prin folosirea etanolului drept solvent organic, se obține lignină cu proprietăți reactive, fracția celulozică putând fi hidrolizată cu ușurință [91]. Biomasa lignocelulozică s-a pretratată cu glicerină brută, care este considerat produsul majoritar rezultat în urma producerii biodieselului. Datorită capacității acestuia de a dizolva lignina, pretratamentul cu glicerină brută conduce la îmbunătățirea randamentului de hidroliză, fiind considerat un proces eficient din punct de vedere economic [97].

I.5.2.3.5. Pretratarea biomasei cu lichide ionice

I.5.2.3.5.1. Lichidele ionice - generalități

Lichidele ionice sunt săruri ionice, organice sau anorganice alcătuite dintr-un anion și un cation, care prezintă o serie de proprietăți importante [98, 99].

În ultimii ani, clasa de lichide ionice s-a extins, iar introducerea unor noi grupări structurale pe părțile cationice sau anionice a făcut posibilă proiectarea unor lichide noi cu proprietăți specifice [98]. Ele sunt compuse din diferiți ioni asimetrici și flexibili, de dimensiuni și forme foarte diferite și implică diferite tipuri de interacțiuni. Se pot sintetiza prin combinația unor anioni (acetat, fosfat, tetrafluoroborat, trifluoroacetat, hexafluorofosfat) cu derivați de imidazoliu, amoniu, fosforiu, piridiniu. Bazele cationice folosite în sinteza lichidelor ionice sunt prezentate în Figura I.20 [100, 101].

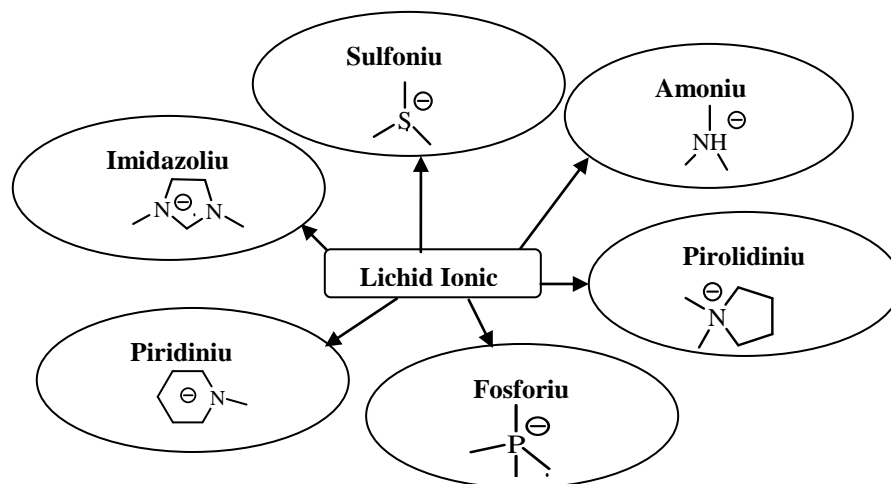


Figura I.20. Bazele catalitice folosite în sinteza lichidelor ionice [100]

Proprietățile lichidelor ionice sunt [98, 99]:

- *punct de topire scăzut*
- *volatilitate foarte mică*: pentru multe lichide ionice, temperatura de fierbere la 1 atm nu poate fi determinată experimental. Lichidele ionice sunt volatile la 200-300°C în condiții de presiune redusă.
- *nu sunt inflamabile*: deoarece lichidele ionice nu sunt volatile, în consecință nu sunt inflamabile la temperatura ambiantă sau temperaturi ridicate.
- *stabilitate termică și chimică*: conform analizei termogravimetrice, lichidele ionice sunt stabile chiar la temperaturi mai mari de 350°C.
- *capacitatea de a dizolva diferiți compuși organici și anorganici*
- *conductivitate ridicată*: conferă lichidelor ionice proprietatea de a acționa ca solvenți sau electroliti în reacțiile electrochimice. Gradul de conductivitate al lichidelor este cuprins între 0,1-20 mS cm⁻¹. Lichidele ionice ce conțin gruparea imidazoliu sunt mai bune conductoare decât lichidele ce conțin gruparea amoniu. Conductivitatea lichidelor ionice este influențată de volatilitatea, densitatea sau mărimea ionilor.
- *Densitatea* : lichidele ionice au densitate mai ridicată decât solvenții organici și apa, valorile fiind cuprinse între 1 și 1,6 g/cm³.
- *Vâscozitatea*: este relativ ridicată, la temperatura de 20-25°C fiind cuprinsă între 66 și 1110 cP. Această proprietate diminuează domeniul de aplicabilitate al lichidelor ionice.
- *Polaritatea*: această este cea mai importantă proprietate care caracterizează capacitatea lichidelor ionice de a dizolva diferiți compuși. Polaritatea lichidelor ionice este greu de analizat deoarece presupune măsurarea a mai multor parametri (forțele electrostatice, legăturile de hidrogen). De exemplu, polaritatea lichidelor ionice se poate determina prin analiza solvatocromică (ecuația Kamlet-Taft), determinarea indicelui de refracție, sau testarea lor în diferite reacții organice [98, 102]. Lichidele ionice sunt, în general, solvenți polari, datorită caracterului lor ionic [102].

- *Toxicitate și biodegradabilitate*: poate fi dedusă prin analiza ciclului de viață a acestora, fiind o procedură complexă și greu de realizat. Cu toate acestea, lichidele ionice prezintă toxicitate și biodegradabilitate scăzută [100].
- *Tensiune superficială*: prezintă tensiune superficială moderată comparativ cu solvenții organici [100]

Unul dintre cuvintele cheie în ceea ce privește lichidele ionice este *diversitatea* (diversitatea de combinații de anioni-cationi, diversitatea modului de preparare, modul de purificare și natura impurităților, diversitatea proprietăților, 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 [98].

Lichidele ionice au atras interesul în ultimele decenii datorită domeniului vast de aplicații: compuși multifuncționali utilizați ca liganți, suporturi, agenți de stabilizare, catalizatori acizi sau bazici, agenți de transfer de faze, lichide ionice protice, compuși chirali, agenți de legare, compuși polari, săruri metalice anionice, amestecuri eutectice [98, 99, 100].

I.5.2.3.5.2. Dizolvarea celulozei în lichide ionice

Dizolvarea celulozei prin scindarea legăturilor puternice de hidrogen intra- și inter-moleculare este un proces eficient din punct de vedere economic și nu afectează mediul înconjurător. În realitate dizolvarea celulozei nu este așa de simplă deoarece în timpul pretratamentului pot fi afectate legăturile glicozidice ale lanțului celulozic datorită condițiilor de reacție, de aceea biopolimerul regenerat prezintă un grad mult mai scăzut de cristalinitate [102]. În anii 1930 s-a descoperit pentru prima dată că celuloza se poate dizolva în topitură de clorură de N-etilpiridiniu [103]. La ora actuală se cunosc o serie de solvenți capabili să dizolve celuloza, cu sau fără derivatizarea ei. Solvenții care derivatizează celuloza acționând asupra legăturilor de hidrogen sunt NaOH/sulfură de carbon, respectiv NaOH/uree. Solvenții cunoscuți pentru dizolvarea directă a celulozei fără derivatizare sunt N-metilmorfolin-N-oxid (NMMO), N,N-dimetilacetamidă/LiCl, dimetilsulfoxid/fluorură de tetrabutilamoniu trihidrat, diverse săruri de litiu cu formula generală $\text{LiX} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\text{X} = \text{I}^-$, NO_3^- , CH_3CO_2^- , ClO_4^-) [102].

În ultimii ani s-a utilizat o nouă clasă de solvenți nevolatili pentru solubilizarea celulozei și anume, lichidele ionice [98, 99, 101, 104]. Studiile efectuate au arătat că unele lichide ionice bazate pe ioni imidazoliu pot dizolva celuloza în mod eficient la temperaturi scăzute ($<100^\circ\text{C}$) [105]. S-au investigat diferite lichide ionice în procesul de dizolvare a celulozei (Tabel I.3) [99].

Aceste lichide ionice conțin diferiți cationi (imidazoliu, piridiniu, pirolidiniu, tetrabutilamoniu, tetrabutilfosforiu, alchilalcoxiamoniu) și diferiți anioni (halogenuri, formați, acetati, amide, imide, tiocianați, fosfați, sulfați, sulfonați și dicloroalumiinați) care le conferă proprietăți diverse [99, 103].

În 2002, s-a demonstrat că diferite lichide ionice ce conțin cationul imidazoliu sunt capabile să dizolve mai mult de 25% din celuloză [99]. Lichidul ionic clorură de 1-butyl-3-metilimidazoliu ([Bmim]Cl) este capabil să dizolve celuloza prin acțiunea lui asupra legăturilor de hidrogen [102, 106]. Aceleași concluzii au fost obținute și prin modelare moleculară într-un studiu ulterior raportat de Novoselov ș.a., în 2007 [107].

Mecanismul de dizolvare a celulozei în [Bmim]Cl este prezentat în Figura I.21 [102].

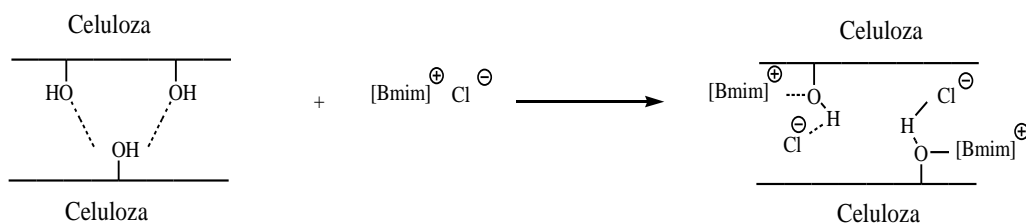


Figura I.21. Mecanismul de dizolvare a celulozei în [Bmim]Cl [102]

S-a demonstrat că [Bmim]Cl este capabil să distrugă structura oligomerilor celulozei (celobioza, celotetroza și celohexoză). Prin scăderea concentrației lichidului ionic în soluție ionică scade solubilitatea celulozei. Pentru a observa eficiența de dizolvare a celulozei în lichide ionice, s-au comparat proprietățile unui solvent care solubilizează celuloza cu proprietățile lichidului ionic utilizat. De exemplu, s-a utilizat un solvent care să nu degradeze celuloza, LiCl/N,N-dimetilacetamidă, care a fost capabil să dizolve 15% celuloză. Aproximativ 25% celuloză microcristalină s-a dizolvat în [Bmim]Cl, în aceleași condiții de reacție, iar prin introducerea probei la ultrasunete cantitatea de celuloză dizolvată a crescut la 28%. Lichidul ionic [Bmim]Cl are capacitatea de a dizolva mai bine celuloza datorită caracterului puternic bazic [99]. Deoarece lichidul ionic [Bmim]Cl este solid la temperatura camerei, iar în timpul încălzirii este foarte vâscos, acesta se consideră a fi ineficient din punct de vedere economic în procesul de dizolvare a celulozei. 10% celuloză microcristalină s-a dizolvat în clorură de 1-alil-3-metilimidazoliu ([Amim]Cl) la 100°C, comparativ cu aceeași cantitate de celuloză dizolvată în formiat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Amim]HCOO) la doar 60°C [103].

Lichidele ionice care conțin cationul dialchilimidazoliu și anionul dicianamidă sunt capabile să dizolve o serie de carbohidrați, inclusiv celuloza [99, 103]. Conform unei alte cercetări, cationii de imidazoliu, piridiu și trietilamoniu, respectiv anionii clorură, acetat și formiat s-au dovedit a fi cei mai buni pentru dizolvarea celulozei [99].

De asemenea, dimetilfosfonatul de 1-etil-3-metilimidazoliu s-a dovedit a fi un solvent eficient în dizolvarea celulozei, datorită caracterului său bazic ridicat [99]. Yang ș.a. au studiat hidroliza enzimatică a celulozei pretratate cu ultrasunete, utilizând ca mediu de reacție apă-lichid ionic dimetilfosfat de 1-metil-3-metilimidazoliu. Randamentul de hidroliză a crescut la 95% în urma pretratării, comparativ cu 42% pentru celuloza netratată [108].

Pentru a reduce costurile de producție și a îmbunătăți stabilitatea termică a lichidelor ionice (ILs) s-au sintetizat o serie de compuși de tip alchilimidazoliu ce conțin anioni pe baza de fosfat [103]. Asemenea lichide ionice sunt: metoximetilfosfat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim](MeO)MePO₂), dimetoxifosfat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim](MeO)₂PO₂), metoxifosfat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim](MeO)HPO₂), dietilfosfat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]Et₂PO₄) și dimetilfosfat de 1,3-dimetilimidazoliu ([Dmim]Me₂PO₂) [103]. Aceste lichide ionice (ILs) s-au sintetizat cu o conversie ridicată, iar compusul principal folosit, achilfosfatul, este ieftin, puțin toxic și ușor de procurat. Punctul scăzut de topire și vâscozitatea ILs bazate pe anioni fosfați au ușurat dizolvarea celulozei [103]. Fukaya ș.a. au raportat că 10% celuloză a fost dizolvată în [Emim][(MeO)HPO₂] după un timp de 30 min, la 45°C [109]. Un studiu mai recent a

arătat că [Emim][Et₂PO₄] poate dizolva până la 14% din celuloză la 100°C [110]. În plus, celuloza recuperată din [Emim][Et₂PO₄] a suferit o degradare mult mai mică decât cea recuperată din alte lichide ionice [103].

Tabelul.I.3. Dizolvarea celulozei în lichide ionice [99]

Lichid ionic	Materie primă	Grad de dizolvare	Condiții
dimetilfosfanat de 1,3-dimetilimidazoliu	Avicel	10%	100°C, 1h
	Avicel	5%	90°C
bromură de 1 ciano-3-metilimidazoliu	Celuloză	3,4%	80-90°C, 20 min
clorură de 1 etil-3-metilimidazoliu	Avicel	10-14%	100°C, 1h
bromură de 1 etil-3-metilimidazoliu	Avicel	1-2%	100°C, 1h
acetat de 1 etil-3-metilimidazoliu	Avicel	15%	110°C
	Avicel	5%	90°C
dimetilfosfat de 1 etil-3-metilimidazoliu	CMC	10%	45°C, 30 min
dietilfosfanat de 1 etil-3-metilimidazoliu	Avicel	12-14%	100°C, 1h
dimetilsulfat de 1 etil-3-metilimidazoliu	Celuloză	<0.5%	110°C
tetrafluoroborat de 1 etil-3-metilimidazoliu	Avicel	Insolubil	90°C
clorură de 1 alil-3-metilimidazoliu	Avicel	5%	90°C
clorură de 1 propil-3-metilimidazoliu	Avicel	<1%	100°C
clorură de 1 butil-3-metilimidazoliu	Avicel	20%	100°C
	Celuloză	13,6%	85°C
formiat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Avicel	8%	110°C
tiocianat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Celuloză Pulpă	5-7%	microunde
dicianamidă de 1 butil-3-metilimidazoliu	Avicel	1%	110°C
acetat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Avicel	12%	100°C, 1h
tetrafluoroborat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Celuloză Pulpă	Insolubil	microunde
hexafluorofosfat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Celuloză Pulpă	Insolubil	microunde
clorură de 1 pentil-3-metilimidazoliu	Avicel	1,5%	100°C
clorură de 1 hexil-3-metilimidazoliu	Avicel	7%	100°C
clorură de 1 heptil-3-metilimidazoliu	Celuloză Pulpă	Putin solubil	100°C
	Avicel	5%	100°C
clorură de 1 octil-3-metilimidazoliu	Avicel	4,5%	100°C
clorură de 1 nonil-3-metilimidazoliu	Avicel	2%	100°C
clorură de 1 decil-3-metilimidazoliu	Avicel	<1%	100°C
Clorură de 1-butil-3-metilpiridină	Avicel	5%	105°C
Acetat de N,N-dimetiletanslamoniu	Avicel	<0,5%	110°C
Acetat de N,N-dimetil-2-metoxietilamoniu	Avicel	<0,5%	110°C
Formiat de N,N,N-tritil-3,6,9-trioxadecilamoniu	Celuloză	10%	110°C
Clorură de N-benzil-N,N-dimetil(tetradecil)amoniu	Celuloză, GP=286	5%	62°C, 12h
Dicianamidă de trihexiltetradecil fosforium	Avicel	<0,5%	110°C

GP reprezintă gradul de polimerizare

Capacitatea de dizolvare a celulozei a crescut prin adăugarea unei soluții de 1% de sare de litiu în soluția de lichid ionic. Aceste săruri de litiu includ LiAc, LiCl, LiBr, LiClO₄ și LiNO₃. Solubilitatea celulozei poate crește până la 19% în soluția de [Bmim]Ac ce conține 1% LiAc [103].

Atunci când celuloza este dizolvată în lichid ionic este important de știut dacă acesta derivatizează sau depolimerizează celuloza [99, 102]. Capacitatea de dizolvare a celulozei în lichide ionice a fost îmbunătățită atunci când vâscozitatea lichidului ionic a fost scăzută, când s-a aplicat un sistem cu ultrasunete sau temperaturi mai ridicate și timp mai lung de pretratare (aproximativ 12 ore), însă timpul și temperatura ridicată pot degrada celuloza [102].

Solvenții clorură de 1-etil-3-metilimidazoliu, clorură de 1-metil-3-metilpiridiniu și clorură de N-benzil-N,N-dimetiltetradecilamoniu nu derivatizează sau depolimerizează celuloza. Gradul de polimerizare al celulozei a scăzut la 650, după dizolvarea în [Amim]Cl, la 80°C. În urma analizei ¹³C RMN, spectrul celulozei dizolvate în [Amim]Cl la 90°C, a prezentat șase unități anhidre de glucoză [103].

Lichidul ionic care conține anionul acetat, fiind mai puțin vâscos, facilitează dizolvarea celulozei la temperaturi mai mici, fără a degrada polimerul. Figura I.22 prezintă dizolvarea completa a 1% Avicel în [EMIM]Ac după 20 minute, observându-se foarte clar scăderea în timp a mărimii și numărului de particule [111].

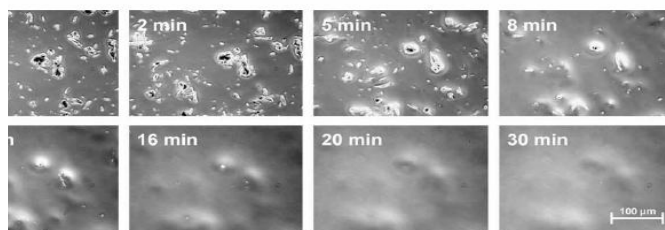


Figura I.22. Imaginea microscopică a celulozei Avicel dizolvate în [Emim]Ac, în timp [111]

Xiao ș.a. au studiat hidroliza enzimatică a celulozei pretratate cu [Bmim]Cl, [Emim]Ac și [Bmim]HCOO. Celuloza regenerată, după dizolvarea în [Bmim]Cl, a fost analizată prin spectroscopie FT-IR. Diferențele apărute între spectrul celulozei pretratate comparativ cu cel al celulozei netratate (deplasările de benzi de la 3430 cm⁻¹ la 3440 cm⁻¹, respectiv modificărilor de benzi de la 1430 cm⁻¹, care dovedesc scindarea legăturilor de hidrogen intermoleculare din celuloza cristalină) arată că după regenerare celuloza prezintă un grad de cristalinitate mai scăzut (Figura I.23). Randamentul de hidroliză al celulozei pretratate cu [Bmim]Cl, [Emim]Ac și [Bmim]HCOO, calculat după 5 ore de reacție la 50°C, a fost de aproximativ 100%, 90,72%, respectiv 88,92% [112].

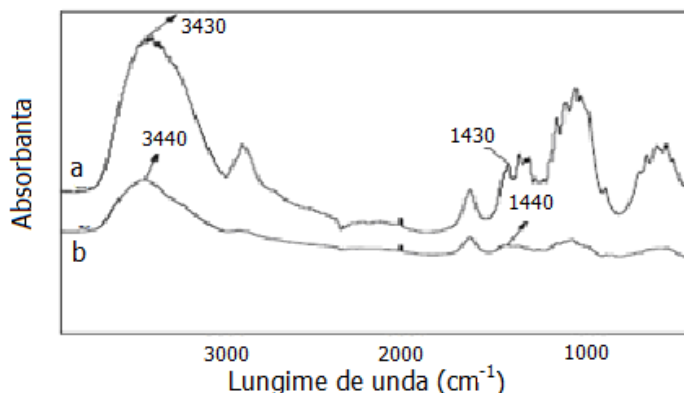


Figura I.23. Spectrul FT-IR al celulozei regenerate din [Bmim]Cl [112]
 a) celuloză nedizolvată
 b) celuloză regenerată

Karatroz ș.a. au arătat că la 150°C celuloza a fost acetilată după doar 20 minute în [Emim]Ac. Acest fapt limitează utilizarea sa la scară industrială în procesul de procesare a biomasei lignocelulozice, cantitatea lichidului ionic scăzând după fiecare recuperare și reutilizare, respectiv crește capacitatea de inhibare a enzimelor celulolitice folosite în procesul de zaharificare [113].

S-a investigat interacțiunea dintre cationul lichidului ionic și celuloză. Pe baza analizei RMN s-a observat că acetatul de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]Ac) formează o legătură covalentă între carbonul C-1 al unității de glucoză și C-2 al cationului imidazoliu, la temperaturi ridicate (Figura I.24). Aceasta s-a observat prin dispariția semnalului carbonului C-1 al unității de glucoză după dizolvare [102]. Această afirmație s-a verificat prin metoda cu fluorescență, confirmând legarea covalentă produsă între cationul de 1-alkil-3-metilimidazoliu și unitatea de glucoză, cât și reducerea cantității de celuloză recuperată [102].

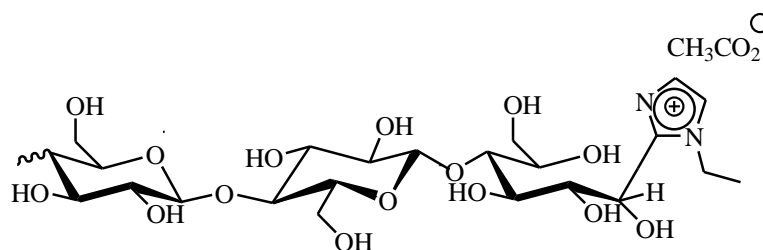


Figura I.24. Legarea covalentă a [Emim]Ac de celuloză [102]

S-a relatat că celuloza regenerată din soluția de acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]Ac) a fost parțial degradată atunci când temperatura de pretratare a fost de 130°C. Lichidul ionic [Bmim]Cl, care este mai vâscos decât [Emim]Ac, a degradat substanțial celuloza la 100°C [99].

S-a studiat influența cationilor și anionilor lichidelor ionice asupra dizolvării celulozei. Zhang ș.a au demonstrat că gruparea alil din cationul 1-alil-3 metilimidazoliu ($[Amim]^+$) determină creșterea solubilității celulozei în lichid ionic, comparativ cu gruparea butil mai lungă a cationului $[Bmim]^+$ [114]. Lichidele ionice ce conțin cationi cu grupări alchil scurte și anionul clorură sunt buni solvenți pentru solubilizarea celulozei [102]. Clorură 1-etil-3-metilimidazoliu ($[Emim]Cl$) este mai eficientă în dizolvarea celulozei decât clorură 1-butil-3-metilimidazoliu ($[Bmim]Cl$) [103].

S-a demonstrat că solubilitatea celulozei scade cu creșterea lanțului alchil din cationul imidazoliu al lichidelor ionice [99]. Această afirmație nu este valabilă în cazul cationilor acetat de 1-butil-3-(3,6,9-trioxadecil)imidazoliu, acetat de 1-etil-3-(4,8,12-trioxadecil)imidazoliu și acetat de 1-(3,6-dioxaheptil)-3-(3,6,9-trioxadecil)imidazoliu. Prezența grupei terminale hidroxil în cation determină scăderea solubilității celulozei în lichidul ionic [99].

Anionii bromură, tetrafluorofosfat, hexafluorofosfat, tiocianat nu sunt eficienți în dizolvarea celulozei [99]. Gradul de dizolvare scade în ordinea următoare: acetat > clorură > bromură > iodură >> hexafluorofosfat. Prin schimbarea anionului clorură cu bromură, s-a observat o scădere a efectului de dizolvare al celulozei [99]. Lichidele ionice ce conțin anionul carboxil sunt lichide la temperatura camerei, sunt mai puțin vâscoase, și sunt capabile să dizolve o cantitate mai mare de celuloză decât lichidele ionice ce conțin anionul clorură [99].

Lichidele ionice pot dizolva o serie de alți carbohidrați cum ar fi: glucoza, zaharoza, lactoza, amiloza, agaroza, α -ciclodextrina și β -ciclodextrina. Lichidul ionic dicianamidă de 1-etil-3-metilimidazoliu și dicianamidă de 1-butil-3-metilimidazoliu dizolvă la temperatura camerei mai mult de 10% glucoză. Capacitatea bună de dizolvare a glucozei, zaharozei, trizaharidelor se datorează caracterului bazic al anionului dicianamidă. De asemenea, lichidele ionice care conțin anionul acetat pot dizolva glucoza, iar cele care conțin cationul imidazoliu sunt capabile să dizolve glucoza, amiloza, α -ciclodextrina și agaroza. Conform unei simulări moleculare, anionul clorură al lichidului ionic $[Bmim]Cl$ interacționează în proporție mai mare cu glucoza, comparativ cu cationul lichidului ionic. Clorura se leagă de hidrogenul grupei hidroxil din unitatea de glucoză, în timp ce doar o moleculă a cationului a interacționat în poziția 2 cu oxigenul din unitatea de glucoză [115]. Lichidele ionice pot fi folosite și ca solvenți de derivatizare a celulozei (carboximetilare, sulfonare, eterificare, acetilare, ftalare, succinilare etc.) [115].

I.5.2.3.5.2.1. Precipitarea celulozei dizolvate în lichide ionice

Celuloza dizolvată poate fi precipitată din soluția de lichid ionic prin adăugarea de anti-solvenți cum ar fi apă, metanol, etanol, 2-propanol, acetonă, diclorometan, cloroform, acetonitril sau tetrahidrofuran [99, 102, 103]. Prin adăugarea apei, ionii lichidului ionic sunt extrași în faza apoasă. Moleculele lichidului ionic sunt protejate de moleculele de apă, împiedicând interacțiunea dintre lichid ionic și celuloză. Analiza RMN și spectroscopia fotoelectronică de raze X au demonstrat o interacțiune puternică a grupărilor hidroxil ale celulozei cu moleculele de apă, însă nu s-a refăcut complet rețeaua legăturilor puternice de hidrogen ale celulozei microcristaline [102]. Aspectul materialului regenerat depinde de metoda și condițiile de regenerare [102]. Când în procesul de dizolvare s-au folosit lichidele ionice clorură de 1-alil-3-metilimidazoliu ($[Amim]Cl$), clorură de 1-butil-3-metilimidazoliu ($[Bmim]Cl$), acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu ($[Emim]Ac$) și alte lichide ce conțin anionii alchilalcoxiacetat, celuloza recuperată a prezentat un grad de

crystalinitate mai scăzut decât celuloza nedizolvată. Valoarea indicelui de cristalinitate a scăzut cu 58-75% pentru celuloza regenerată, comparativ cu celuloza standard [99]. Timpul și temperatura de pretratare, natura și concentrația lichidului ionic, precum și metoda de precipitare a celulozei influențează regenerarea și structura celulozei [102].

I.5.2.3.5.3. Dizolvarea ligninei în lichide ionice

Metodele tradiționale de extracție a ligninei din biomasă se bazează pe procesul Kraft cu solvenți organici, procedeul alcalin sau cu sulf, la temperaturi înalte de aproximativ 165°C și presiuni de 0,7 MPa. Acest proces poluează mediul înconjurător și este dezavantajos din punct de vedere economic. O altă metodă de obținere a ligninei din biomasa lignocelulozică este cea cu acid fosforic, acid acetic sau acid formic, însă coroziunea și mediul acid sunt principalele dezavantaje ale acestui proces [115].

S-a studiat dizolvarea ligninei în diferite lichide ionice ce conțin cationii: metil-, etil-, alil-, butil-, hexil-, benzil-imidazoliu și anionii clorură, bromură, tetrafluoroborat, acetat, trifluorometansulfonat și metilsulfat [99, 102]. Tan ș.a au studiat dizolvarea ligninei din borhot în prezența unui amestec de lichide ionice ce conțin 1-etil-3-metilimidazoliu și anionii alchilbenzensulfat. Eficiența de extracție a ligninei a fost de 93%. Cantitatea de lignină recuperată din soluția de lichid ionic a fost de 118%, acesta datorându-se resturilor de metilbenzensulfat neîndepărtate din lignină [116].

S-a descoperit că lichidele ionice dizolvă doar parțial lignina limitând astfel afinitatea enzimei față de celuloza din biomasă. S-a demonstrat că lichidele ionice metoxisulfat de 1,3-dimetilimidazoliu ([Mmim]CH₃OSO₃), trifluorometansulfonat de 1-butyl-3-metilimidazoliu ([Bmim]CF₃SO₃), metoxisulfat de 1-butyl-3-metilimidazoliu ([Bmim]CH₃OSO₃), acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]Ac), clorură de 1-alil-3-metilimidazoliu ([Amim]Cl), clorură de 1-butyl-3-metilimidazoliu ([Bmim]Cl), clorură de 1-benzil-3-metilimidazoliu ([Bzmim]Cl) și lichidele ionice ce conțin amide policiclice și diferiți cationi sunt solvenți capabili să dizolve parțial lignina din biomasa lignocelulozică [99, 103, 117]. Solubilitatea ligninei din lemnul de esență moale la temperatura camerei, în metilsulfat de 1,3-dimetilimidazoliu ([Mmim]MeSO₄) și în metilsulfat de 1-butyl-3-metilimidazoliu ([Bmim]MeSO₄) a fost de 74 g/L, respectiv 62 g/L. Odată cu creșterea temperaturii la 50°C, solubilitatea ligninei în aceste două lichide ionice a crescut la 344 g/L, respectiv 312 g/L [100]. Lichidul ionic [Emim]Ac s-a dovedit a fi un bun solvent în dizolvarea celulozei cât și a ligninei însă în timpul procesului de dizolvare celuloza poate suferi anumite modificări ale structurii, în timp ce lignina a fost neafectată [117]. Tabelul I.4 prezintă gradul de dizolvare a ligninei în diferite lichide ionice și condițiile de dizolvare [99]. La 90°C, [Emim]Ac a fost capabil să dizolve, după 24 ore de reacție, aproximativ 300 g/Kg lignină Kraft (Tabelul I.4) [99]. Kim ș.a au studiat extracția ligninei din plop cu lichidul ionic [Emim]Ac. După 16 ore de pretratare, la 110°C, [Emim]Ac a fost capabil să dizolve aproximativ 4,4% lignină [118].

Lichidele ionice [Amim]Cl și [Bmim]Cl au dizolvat după 8 ore, la 110°C, aproximativ 8% lignină din molid. La 130°C, lichidul ionic clorură de 1-benzil-3-metilimidazoliu ([Bzmim]Cl) a dizolvat, după 8 ore, aproximativ 5% lignină din molid [103]. Capacitatea de dizolvare a ligninei diferă de natura lichidului ionic. De exemplu, pentru lichidele ionice ce conțin cationul [Bmim]⁺, capacitatea de dizolvare

a ligninei scade în ordinea următoare a anionilor: $[\text{MeSO}_4]^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- >>> \text{PF}_6^-$ [103].

Tabelul I.4. Dizolvarea ligninei în diferite lichide ionice [99]

Lichidul ionic	Materie primă	Grad de dizolvare	Condiții
metilsulfat de 1,3-dimetilimidazoliu	Lignină Kraft din lemn de esență moale	344 g/L	50°C
	Lignină Kraft	>500 g/Kg	90°C, 24h
bromură de 1 ciano-3-metilimidazoliu	Lignina cu un conținut scăzut de sulfonați	9,5%	80-90°C, 20 min
acetat de 1 etil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft	>300g/Kg	90°C, 24h
dialchil-benzensulfonat de 1 etil-3-metilimidazoliu	Borhot din trestie de zahăr	97% din lignină extrasă ~23g/Kg	190°C, 90min
clorură de 1 alil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft	>300 g/Kg	90°C, 24h
bromură de 1 propil-3-metilimidazoliu	Lignină cu un conținut scăzut de sulfonați	6,2%	80-90°C, 20min
clorură de 1 butil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft din lemn de esență moale	13,9 g/L	75°C
	Lignină cu un conținut scăzut de sulfonați	8,8%	80-90°C, 20 min
	Lignină Kraft	>100 g/Kg	90°C, 24h
bromură de 1 butil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft din lemn de esență moale	7,5 g/L	75°C
tetrafluoroborat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft	40 g/Kg	90°C, 24h
hexafluorofosfat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft	1 g/Kg	90 °C, 24h
trifluorometansulfonat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft	>500 g/Kg	90°C, 24h
metilsulfat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft din lemn de esență moale	312 g/L	50°C
tetrafluoroborat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft din lemn de esență moale	14,5 g/L	70-100°C
trifluorometansulfonat de 1 hexil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft din lemn de esență moale	275 g/L	50°C
clorură de 1 benzil-3-metilimidazoliu	Lignină Kraft	>100 g/Kg	90°C, 24h
clorură de 1,8-diazobicyclo[5.4.0]-undec-7-enium	Sulf Lignină	Dizolvat	150°C, 24h
formiat de 1,8-diazobicyclo[5.4.0]-undec-7-enium	Sulf Lignină	Dizolvat	100°C, 24h

Pinket ș.a au studiat extracția ligninei din rumegușul de pin fără a dizolva sau degrada celuloza utilizând lichidele ionice sintetizate în laborator 6-metil-2,2-dioxo-2H-1,2,3-oxatiazin-4-on de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]Ace), 6-metil-2,2-dioxo-2H-1,2,3-oxatiazin-4-on de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]Ace) [119].

Lignina dizolvată poate fi recuperată din soluția de lichid ionic prin precipitare cu diferiți solvenți (apă în exces sau acetonă) [119, 120]. Figura I.25 prezintă imaginile rezidului celulozic și ligninei regenerate la diferite temperaturi de pretratare [119].

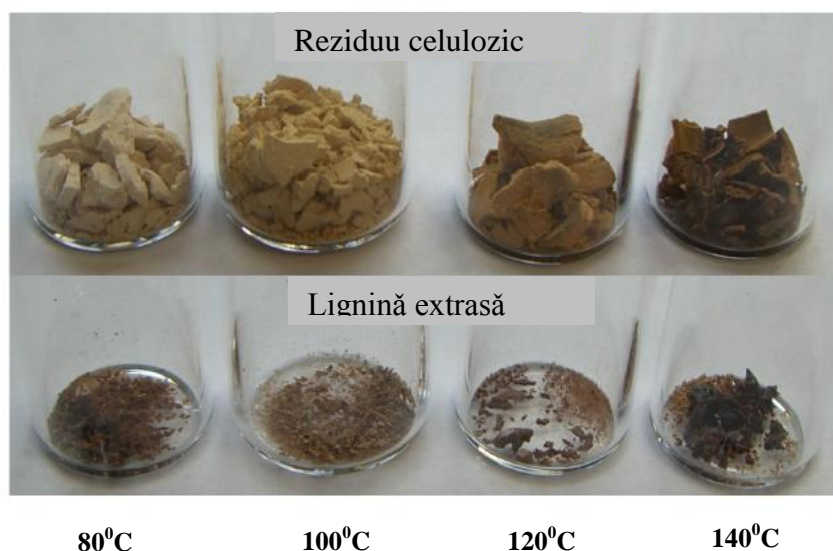


Figura I.25. Imaginea rezidului celulozic și ligninei regenerate după pretratarea pinului cu acesulfamat de 1-butil-3-metilimidazoliu [119]

Lichidele ionice bromură de 1-butil-3-metilimidazoliu, tetrafluorborat de 1-butil-3-metilimidazoliu, tetrafluorborat de 1-butil-2,3-dimetilimidazoliu, hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu nu sunt buni solvenți pentru dizolvarea ligninei [99].

Masa moleculară a ligninei extrase din materialul lignocelulozic prin diferite proceduri (prin procedeul Kraft, procedeul cu sulf, procedeul alcalin sau cu solvenți organici), a fost cuprinsă între 1000 g/mol și 20000 g/mol. Gradul de polimerizare a fost foarte greu de măsurat deoarece, după extracție, structura ligninei s-a modificat [120]. Cantitățile de lignină extrase din paie de trestie de zahăr, cu lichidele ionice alilbensulfat de 1-etil-3-metilimidazoliu, care a avut mase moleculare de aproximativ 2220 g/mol conțin 1,5% sulf, între 0,6-2% cenușă și mici cantități de hemiceluloză (<0,1%) [120].

I.5.2.3.5.4. Dizolvarea biomasei lignocelulozice în lichide ionice

Eficiența de dizolvare a biomasei lignocelulozice depinde de tipul de biomasă, timpul de dizolvare, temperatura de dizolvare, mărimea particulelor biomasei, conținutul de apă din lemn și raportul biomasă-lichid ionic folosit [99]. Unul dintre principalele avantaje ale utilizării lichidelor ionice în procesul de conversie a biomasei este capacitatea acestora de a dizolva o cantitate mare de celuloză și lignină, iar volatilitatea scăzută permite ca reacția să se poată desfășura la temperaturi ridicate [99, 115]. Caracterul inherent bazic sau acid al lichidelor

ionice permite amestecarea acestora cu diferiți solvenți sau catalizatori, astfel scăzând costurile procesului [115]. În prezența lichidelor ionice, pe lângă interacțiunile ionice care au loc între celuloza din biomasă și lichidul ionic, mai au loc și interacțiuni Van der Waals. Lichidele ionice acționează asupra legăturilor de hidrogen din biomasa lignocelulozică rupând rețeaua tridimensională, proces datorat anionilor. Cationii interacționează cu celuloza, în special cu gruparea hidroxil [99, 102]. S-a demonstrat că între cationii lichidelor ionice și compușii aromatici din lignină există interacțiuni π - π [99, 108]. Tabelul I.5 prezintă dizolvarea biomasei lignocelulozice în diferite lichide ionice [99].

Unii dintre cei mai buni solvenți care dizolvă biomasa lignocelulozică sunt: [Amim]Cl (dizolvă eficient bradul, fagul, stejarul, castanul), [Bmim]Cl și [Emim]Ac [99, 108, 117, 121]. Lichidul ionic [Amim]Cl are capacitatea de a dizolva lemnul datorită prezenței electronilor π atât în lanțul alchenil cât și în inelul imidazolic [99].

Jiang ș.a au studiat pretratarea paielor de orez prin barbotare de abur și lichidul ionic clorură de 1-alil-3-metilimidazoliu ([Amim]Cl) timp de 2-3 ore și temperatura de 40-60°C. Celuloza regenerată a fost purificată cu 2% H₂O₂ pentru îndepărtarea ligninei și lichidului ionic rămas, și caracterizată prin microscopia de scanare electronică (SEM), spectroscopia FT-IR și RMN CP/MAS ¹³C. Rezultatele au arătat că lichidul ionic [Amim]Cl a fost capabil să dizolve 30,72% celuloză din paiete de orez. După regenerare și purificare, celuloza nu conține lignină, însă prezintă aproximativ 0,85% hemiceluloză. Fibrele de celuloză regenerată, de lungimi mai mari de 100 μ m, au putut fi observate prin tehnica SEM (Figura I.26). În aceste condiții (40-60°C, 2-3 ore) lichidul ionic [Amim]Cl nu a dizolvat lignina din biomasă [122].

La 130°C, lichidele ionice [Amim]Cl și [Bmim]Cl au fost capabile să dizolve oproximativ 7% molid după 8 ore de pretratare. În aceleași condiții (130°C, 8 ore), lichidul ionic clorură de 1-benzil-3-metilimidazoliu ([Bzmim]Cl) a dizolvat 5% molid [121]. Odată cu creșterea temperaturii de pretratare, crește capacitatea de dizolvare a biomasei. De exemplu, la 110°C, 2% pin a fost dizolvat după 8 ore în [Amim]Cl, iar la 130°C s-a dizolvat 5% pin în același lichid ionic [121].

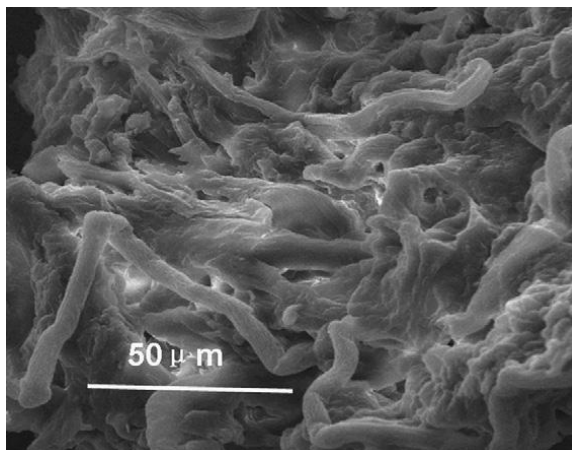


Figura I.26. Imaginea SEM a celulozei din paiete de orez [122]

Tabelul I.5. Dizolvarea biomasei lignocelulozice în lichide ionice [99]

Lichid ionic	Biomasă Lignocelulozică	Grad de Dizolvarea	Condiții
metansulfonat de 1,3-dimetilimidazoliu	Făină de arțar	Foarte scăzută	80°C, 24h
dimetilfosfanat de 1,3-dimetilimidazoliu	Molid	Parțial 5%	90°C
clorură de 1 etil-3-metilimidazoliu	Molid	Parțial 5%	90°C
acetat de 1 etil-3-metilimidazoliu	Molid	Complet	90°C
	Pin galben sudic, 0,25-05mm	92.6%	110°C, 16h
	Plop	92% conversie la glucan după hidroliză	120 °C, 24h
clorură de 1 alil-3-metilimidazoliu	Făină de arțar	>30 g/kg	90°C, 24h
	Molid măcinat	7%	130°C, 8h
	Molid	Complet 5%	90°C
Clorură de 1 butil-3-metilimidazoliu	Pin	67%	100°C, 24h sosolvent DMSO-d ₆
	Plop	68%	100°C, 24h cosolvent DMSO-d ₆
	Stejar	56%	100°C, 24h cosolvent DMSO-d ₆
	Eucalipt	64%	100°C, 24h cosolvent DMSO-d ₆
	Molid măcinat	7%	130°C, 8h
	Molid	Parțial 5%	90°C
	Pin galben sudic, 0,35-0.5mm	26%	110°C, 16h
	Rășinoase	Parțial	150°C
	Făină de arțar	<0,1 g/kg	90°C, 24h
	Făină de arțar	<0,1 g/kg	90°C, 24h
tetrafluoroborat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Făină de arțar	<0,1 g/kg	90°C, 24h
Hexafluorofosfat de 1 butil-3-metilimidazoliu	Făină de arțar	>30 g/kg	90°C, 24h
clorură de 1 benzil-3-metilimidazoliu	Pin sudic	2%	130°C, 8h
dicianamidă de 1 benzil-3-metilimidazol	Așchii sau plop măcinat	Dizolvat	150°C, 24h
clorură de 1 (3-metoxibenzil-3-metilimidazoliu	Așchii sau plop măcinat	Dizolvat aproape complet	100°C, 24h

Pretratarea rădăcinoaselor cu un amestec de apă/[Bmim]Cl a fost investigată de Wei ș.a. La 150°C și 0,1 MPa, aproximativ 29,1% din biomasă s-a dizolvat după 2 ore, în amestecul 20% apă și 80% lichid ionic, comparativ cu 9,8% atunci când s-a folosit 100% [Bmim]Cl. Lichidul ionic a putut fi reutilizat de 7 ori, însă de la a patra reutilizare eficiența de pretratere a scăzut la 16,6% [123]. Li ș.a. au pretratut paiele cu clorură de 1-butil-3 metilimidazoliu ([Bmim]Cl), dietilfosfat de

1-etil-3-metilimidazolium ([Emim]DEP) și N-metil-morfolină N-oxid (NMMO). Lichidul ionic [Emim]DEP a fost cel mai eficient în pretratarea biomasei deoarece cantitatea de zaharuri eliberată după 12 ore de reacție a fost de 4,8 mg/ml în urma hidrolizei enzimatică a biomasei pretratate, comparativ cu 4,3 mg/ml eliberate în urma hidrolizei biomasei pretratate cu [Bmim]Cl și 4,7 mg/ml în urma hidrolizei biomasei pretratate cu NMMO. Deoarece [Bmim]Cl este toxic și coroziv, iar NMMO este un oxidant puternic, lichidul ionic [Emim]DEP a fost folosit în studiile de optimizare a condițiilor de pretratare și în studiile de reutilizare. Condițiile optime de pretratare, pentru care randamentul de hidroliză a fost maxim, de aproximativ 55%, au fost: timpul de pretratare de 30 minute și temperatura de 130°C. [Emim]DEP s-a reutilizat de 5 ori, randamentul de hidroliză nefiind mai mic de 52,8% [124].

Fort ș.a. au studiat dizolvarea a patru tipuri de biomasă de tip lemn de esență tare și lemn de esență moale (pin, eucalipt, plop și stejar) în lichidul ionic [Bmim]Cl. În amestec s-a adăugat și o cantitate mică de dimetilsulfoxid, acest solvent având rolul de a facilita analiza directă a materialului dizolvat prin tehnica C^{13} RMN, cât și de a scădea vâscozitatea amestecului. Prin creșterea timpului de pretratare culoarea s-a intensificat, indicând o dizolvare mai bună a biomasei lignocelulozice. În cazul pinului, 44% din materialul celulozic s-a dizolvat în lichid ionic/dimetilsulfoxid după 12 ore, iar cantitatea de material celulozic dizolvată din stejar a fost de 35% la același timp de pretratare. În urma analizei celulozei regenerate din soluția de lichid ionic prin tehnica C^{13} RMN s-a observat o minimă degradare a celulozei atunci când timpul de pretratare a fost cuprins între 12-24 ore. S-a observat că lichidul ionic [Bmim]Cl este capabil să dizolve parțial lignina și celuloza din biomasa lignocelulozică, celuloza fiind cu succes precipitată fără a se observa urme de lignină sau hemiceluloză [106].

Sun ș.a. au studiat pretratarea a două tipuri de lemn (lemnul de esență moale de pin, respectiv lemnul de esență tare de stejar) cu două lichide ionice [Emim]Ac și [Bmim]Cl. La 110°C, lichidul ionic [Emim]Ac a dizolvat complet 1% biomasă de pin, după 46 ore, și 1% biomasă de stejar, după 25 ore de pretratare. În consecință, dintre cele două tipuri de biomasă studiate lemnul de esență tare a fost dizolvat mai mai repede de [Emim]Ac decât lemnul de esență moale. S-a observat că lichidul ionic [Emim]Ac are capacitatea de a dizolva o cantitate mai mare de celuloză și lignină comparativ cu [Bmim]Cl. La 110°C, timp de 16 ore, [Emim]Ac a dizolvat 93,5% din pin, iar [Bmim]Cl a dizolvat 26,0% din pin. Aceasta probabil se datorează faptului că anionul acetat are caracter bazic mai puternic decât anionul clorură, astfel eficiența de rupere a legăturilor de hidrogen din celuloză crește. Gradul de dizolvare a biomasei a fost îmbunătățit prin încălzirea probei sau introducerea acesteia într-un sistem cu microunde sau ultrasunete. Aproximativ 26,1% și 34,9% lignină s-a dizolvat cu [Emim]Ac din lemnul de pin, respectiv stejar în condițiile de pretratament studiate. Lignina dizolvată s-a recuperat prin adăugarea unui amestec de apă/acetone în raport volumic 1:1, iar cantitatea de lignină extrasă a fost de 31% pentru lignina dizolvată din biomasa de pin, respectiv 38% pentru lignina dizolvată din biomasa de stejar [125]. După doar 6 ore de pretratament la 110°C, s-a observat o mică degradare a celulozei [99]. Pentru a evita degradarea sau acetilarea celulozei și modificarea structurii lichidului ionic este necesar să se lucreze la timp de pretratare și temperaturi scăzute [99, 113, 125]. Din Figura I.26 se observă că la amestecarea biomasei fin măcinată cu [Emim]Ac s-a obținut o soluție vascoasă de culoare maronie, aceasta datorându-se probabil compusilor aromatici din lignină și diverselor substanțe extrase din lemn [111].

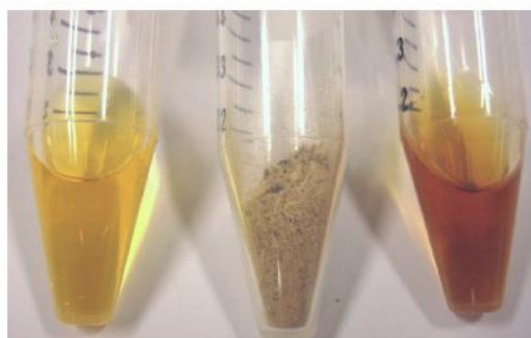


Figura I.26. Dizolvarea biomasei lignocelulozice în [Emim]Ac [111]

Pu ș.a au raportat că mai mult de 20% lignină din biomasa de pin poate fi dizolvată în lichidele ionice trifluorometansulfat de 1-hexil-3-metilimidazoliu (la 70°C solubilitatea ligninei a fost de 272 g/L), în metansulfat de 1-metil-3-metilimidazoliu (la 50°C solubilitatea ligninei a fost 344 g/L) și metansulfat de 1-butil-3-metilimidazoliu (la 50°C solubilitatea a fost de 312 g/L) [126].

Pretratarea ierburilor cu [Emim]Ac a determinat creșterea semnificativă a randamentului de hidroliză a biomasei pretratate, a redus cristalinitatea celulozei, a mărit suprafața de contact a substratului și a dizolvat parțial lignina. Li ș.a. au comparat două metode de pretratare a ierburilor: pretratarea cu acid diluat și pretratarea cu lichidul ionic [Emim]Ac. Pretratarea biomasei cu acid sulfuric diluat a determinat creșterea indicelui de cristalinitate de la 26,2 (pentru biomasa netratată) la 39,1. În urma pretratamentului ierburilor cu [Emim]Ac indicele de cristalinitate al celulozei a scăzut la 2,6. Eficiența de hidroliză în cazul ierburilor pretratate cu [Emim]Ac a crescut cu 16% față de biomasa pretrată cu acid diluat, respectiv cu 54% față de biomasa netratată [127].

Samayam ș.a. au studiat pretratarea celulozei Avicel, a plopului și a ierburilor pretratate cu [Emim]Ac timp de 30 minute la 120°C. În urma pretratării cu [Emim]Ac, pentru rumegușul de plop s-a observat o scădere a cantității de xilan cu 15% din cantitatea inițială, și de lignină cu 7% din cantitatea inițială. După pretratarea ierburilor s-a observat o pierdere de xilan de 32% din cantitatea inițială, respectiv 27% lignină. Indicele de cristalinitate al celulozei a scăzut după pretratament, pentru toate tipurile de biomasă studiate (de la 38 la 8 pentru plop, de la 21 la 6 pentru ierburi, respectiv de la 58 la 14 pentru celuloza Avicel). În urma pretratării biomasei, randamentul de hidroliză a crescut substanțial, indiferent de enzimele folosite la hidroliză. De exemplu, când biomasa a fost catalizată de complexul enzimatic Spezyme, randamentul de hidroliză, calculat după 24 ore de reacție, a fost de 85% pentru plopul pretratat, 91% pentru ierburile pretratate, comparativ cu plopul netratat și ierburile netratate unde randamentul de hidroliză a fost de 5%, respectiv 12% [128]. Lee ș.a au observat că după 90 minute de pretratare a lemnului cu [Emim]Ac, la temperatura de 110°C, s-a dizolvat o cantitate de 15% celuloză, 16% xilan și de 46% lignină din biomasă [129]. Odată cu creșterea timpului și temperaturii de pretratare (de la 0,5 la 70 ore, 50°C la 130°C) scade indicele de cristalinitate a celulozei și crește cantitatea de lignină dizolvată [127, 129]. Labbe ș.a au demonstrat, de asemenea, că lichidul ionic [Emim]Ac a fost mai eficient la pretratarea plopului decât lichidele ionice [Bmim]Ac și [Bmim]Cl.

Randamentul de hidroliză calculat după 48 ore de reacție, a fost de 38% pentru biomasa de plop pretrată timp de 1 oră cu [Emim]Ac, și de doar 5% pentru biomasa netratată. La 60-80°C, celuloza a fost foarte puțin degradată în urma pretratământului cu [Emim]Ac după 72 ore de pretratare [130]. La temperaturi de pretratare între 25-120°C, lichidele ionice acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]Ac), dietilfosfat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]DEP) și metilsulfat de 1,3-dimetilimidazoliu ([Mmim]MeSO₄) folosite la pretratarea rădăcinoaselor de Cassava (<38 μm) nu au degradat biomasa. Dintre lichidele ionice folosite la pretratarea rădăcinoarelor de Cassava, cel mai eficient a fost, de asemenea, [Emim]Ac. Conversia biomasei pretratate cu [Emim]Ac, sau cu [Emim]DEP a fost de 90,03%, respectiv 75,03% atunci când temperatura de pretratare a fost de 120°C. Cantitatea de lignină dizolvată în lichidele ionice [Emim]Ac, [Emim]DEP și [Mmim]MeSO₄ a crescut până la 120°C, iar la temperaturi mai mari de 120°C cantitatea de lignină dizolvată a rămas aceeași. Cantitatea maximă de lignină extrasă din biomasa, după 24 ore de pretratare cu [Emim]Ac, a fost de aproximativ 94% [131].

Moniruzzaman ș.a. au studiat delignifierea biomasei de *Chamaecyparis obtusa* cu lichidul ionic [Emim]Ac și lacaze. Delignifierea enzimatică a biomasei cu lacaze, urmată de delignifierea cu [Emim]Ac a fost mai eficientă decât metoda simplă de delignifiere cu lichid ionic. 50% lignină a fost extrasă din lemn, după 24 ore, cu lacaze și lichid ionic, comparativ cu 10% lignină extrasă doar cu lichid ionic [132].

Lichidele ionice care conțin anionii tetrafluoroborat și hexafluorofosfat nu au fost capabile să dizolve materialul lignocelulozic [99, 125].

I.5.2.3.5.5. Influența lichidelor ionice asupra activității celulazice

În general, cationii și anionii lichidelor ionice joacă un rol important în stabilizarea proteinelor în prezența apei.

Ele acționează în trei moduri diferite:

- interacționează cu substanțele și/sau produșii;
- preiau apa esențială din enzime, la fel ca și solvenții;
- au interacțiuni electrostatice cu enzima [133].

Baker ș.a. au studiat conformația proteinelor și termostabilitatea în lichide ionice, cu ajutorul spectroscopiei de fluorescență. Monelina a fost utilizată ca și proteină de testare, datorită faptului că are molecula mică, nu conține punți disulfurice și este bine structurată. Această proteină a arătat că are stabilitate extremă în [*bis* 1-butil-1-metilpirolidin sulfonil trifluorometan] imidă ([BmPy] Tf₂N) [134].

Relația structură dinamică-funcție a fost investigată cu ajutorul unor metode structurale cum ar fi fluorescența și spectrometria CD. Lipaza din *Candida antarctica* B și α-chimotripsina au fost stabilizate cu ajutorul lichidelor ionice bis(trifluorometan sulfonil)imidă de 1-etil-3-metilimidazolium ([Emim]Tf₂N) și bis(trifluorometan sulfonil)imidă de butil-trimetilamoniu ([Btma]Tf₂N), timpul de înjumătățire a activității crescând semnificativ comparativ cu cele în care s-au utilizat solvenți organici. Lichidele ionice au fost capabile să mențină activă enzima și să prevină descompunerea termică (Figura I.27). Enzimele și alte molecule și macromolecule sunt prinse în rețeaua de legături de hidrogen și se generează nanostructuri cu regiuni polare și nepolare. Stabilizarea acestor compuși are loc în principal datorită efectelor electronice și sterice furnizate de nanostructurile lichidelor ionice de tipul $\{[(DAI)_x(X)_{x-n}]_n + [(DAI)_{x-n}(X)_x]_n\}$ [133].

Este important să existe o relație între datele referitoare la stabilitatea proteinei și datele referitoare la activitatea proteinei pentru a înțelege mai bine efectul diferitor lichide ionice asupra biomacromoleculor. Polaritatea, investigațiile legate de cosmotropicitate și diferite studii spectroscopice s-au luat în calcul pentru găsirea unei explicații referitoare la abilitatea de stabilizare a proteinelor în lichide ionice. Toate aceste metode au demonstrat că lichidele ionice sunt capabile să genereze și să mențină un mediu neconvențional excelent pentru anumite proteine. Acesta este motivul pentru care ele pot fi utilizate ca și solvenți în transformările biocatalitice [133].

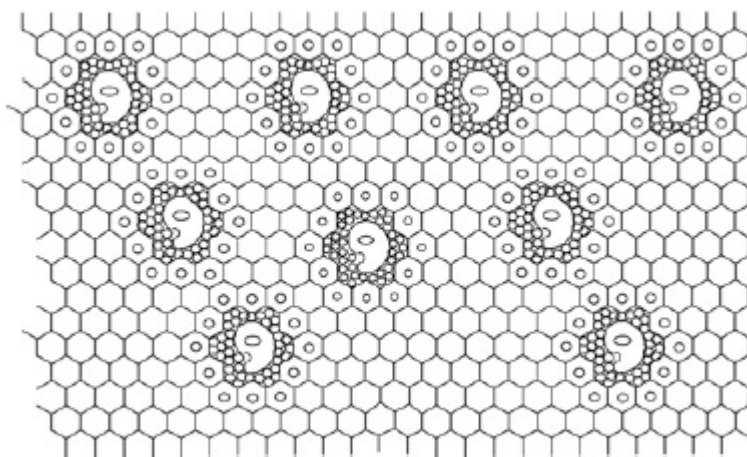


Figura I.27. Enzime cu cantități mici de apă închise în rețeaua de lichid ionic

Engel ș.a au studiat efectul a patru lichide ionice (dimetilfosfat de 1,3-dimetilimidazoliu, clorură de 1-alil-3-metilimidazoliu, clorură de 1-butil-3-metilimidazoliu și acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu) asupra activității celulazice. Chiar și o concentrație mică de 10% lichid ionic adăugată în reacția de hidroliză enzimatică a celulozei a dus la scăderea activității celulazei. Toate cele patru lichide ionice testate au determinat scăderea activității cu 15-30%, comparativ cu activitatea celulazei în mediu apos. Lichidul ionic care a inactivat cel mai repede enzima a fost dimetilfosfatul de 1,3-dimetilimidazoliu. S-a observat că odată cu creșterea concentrației de lichid ionic crește vâscozitatea amestecului, crește pH-ul mediului de reacție, iar la o concentrație de 30% lichid ionic activitatea celulazică a scăzut la 60% din cea inițială. Creșterea vâscozității și tăriei ionice a mediului de reacție au determinat scăderea activității catalitice. Atunci când concentrația de lichid ionic a fost de 10%, activitatea celulazei a scăzut cu 40% după prima zi, menținându-se aproximativ aceeași după 10 zile, iar în mediu de soluție tampon activitatea enzimei a fost aceeași în intervalul de timp studiat. Menținerea constantă a activității, în lichid ionic, după un anumit interval de timp probabil se datorează acomodării enzimei în mediul de lichid ionic.

Celulaza din *Penicillium janthinellum* modificată genetic a avut o stabilitate bună chiar și după cinci zile de menținere în mediu de clorură de 1-butil-3-metilimidazoliu. Ceșterea concentrației de lichid ionic a determinat scăderea

semnificativă a activității celulazei, astfel la o concentrație de 50% dimetilfosfat de 1,3-dimetilimidazoliu enzima a fost complet inactivată. De asemenea, s-a determinat activitatea a patru tipuri de celulaze Celluclast din diferite loturi în prezența a 10% dimetilfosfat de 1,3-dimetilimidazoliu, activitatea catalitică a celulazelor scăzând cu aproximativ 20%. O concentrație de 20% de acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu determină scăderea cu 90% a activității enzimatică a celulazei, iar la 50% lichid ionic în mediul de hidroliză celulaza a fost complet inactivată [135].

S-a investigat efectul lichidului ionic dimetilfosfat de 1-metil-3-metilimidazoliu [Mmim]DMP asupra celor trei enzime ce alcătuiesc complexul celulazic (celobiohidrolaza CBH I, endo β -glucanaza EG I și β -glucozidaza BG). Odată cu creșterea concentrației de [Mmim]DMP a scăzut semnificativ activitatea celor trei enzime. Enzimele EG I și CBH I obținute din compexul celulazic Celluclast de la Novozyme au avut activitatea catalitică cu 30% mai mică decât activitatea inițială în prezența a 10% lichid ionic, în timp ce la o concentrație de [Mmim]DMP de 15%, β -glucozidaza BG comercială de la Novozyme a fost complet inactivată. După 6 zile de incubare activitatea glucanazelor EG I, CBH I și BG în 10% [Mmim]DMP a scăzut la 69%, 62% respectiv 54% din valoarea inițială, comparativ cu activitatea enzimelor în soluție tampon care după 6 zile nu a scăzut cu mai mult de 10% [136]. Bharadwaj ș.a au observat că prin creșterea concentrației de acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu [Emim]Ac activitatea enzimelor EG I și CBH I a scăzut liniar [137].

S-a observat că lichidele ionice care dizolvă eficient celuloza inactivează complet celulaza după câteva ore. Lozano ș.a. au studiat efectul unor lichide ionice (tetrafluoroborat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]BF₄), bis(trifluorometilsulfonil)imidă de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]NTf₂), bis(trifluorometilsulfonil)imidă de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]NTf₂), bis(trifluorometilsulfonil)imidă de 1-octil-3-metilimidazoliu ([Omim]NTf₂), hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]PF₆), hexafluorofosfat de 1-octil-3-metilimidazoliu ([Omim]PF₆), tetrafluoroborat de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]BF₄), tetrafluoroborat de 1-octil-3-metilimidazoliu ([Omim]BF₄), tetrafluoroborat de 1-dodecil-3-metilimidazoliu ([Ddmim]BF₄), bis(trifluorometilsulfonil)imidă de 1-dodecil-3-metilimidazoliu ([Ddmim]NTf₂), hexafluorofosfat de 1-dodecil-3-metilimidazoliu ([Ddmim][PF₆), bis(trifluorometilsulfonil)imidă de butiltrimetilamoniu ([N₁₁₁₄]NTf₂), bis(trifluorometilsulfonil)imidă de metiltrioctilamoniu ([N₁₈₈₈]NTf₂) și clorură de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]Cl) asupra activității celulazei native și imobilizate pe o rășină Amberlite XAD4. Lichidele ionice [Bmim]NTf₂ și [N₁₁₁₄]NTf₂, datorită anionului cu caracter hidrofobic îmbunătățesc activitatea celulazei imobilizate, comparativ cu activitatea obținută în mediu de soluție tampon. Activitatea catalitică calculată după primele 5 ore de reacție rămâne aceeași și după o săptămână. Tabelul I.6 prezintă activitatea reziduală a celulazei imobilizate calculată după 5 zile de incubare, în prezența a diferitor lichide ionice cu caracter hidrofob. Celuloza imobilizată a fost mai stabilă în lichidele ionice ce conțin anionul [Tf₂]⁻, activitatea enzimei imobilizate crescând odată cu creșterea lanțului alchil al cationului. Cele mai bune rezultate s-au obținut când s-a folosit lichidul ionic cu amoniu, activitatea reziduală a celulazei imobilizate, după 5 zile de reacție, fiind de 40% din activitatea inițială. Lichidele ionice hidrofobe care nu sunt capabile să dizolve celuloza au în schimb capacitatea de a menține stabilă activitatea celulazei în timp, însă lichidele ionice hidrofile, de exemplu [Bmim]Cl, inactivează complet celulaza după câteva ore de incubare [138].

Tabelul I.6. Activitatea reziduală a celulozei imobilizate după incubare timp de 5 zile la 80°C în lichide ionice [138]

Lichid ionic	Activitate reziduală (%)
[Emim][NTf ₂]	17,6
[Bmim][NTf ₂]	27,2
[Omim][NTf ₂]	34,3
[Ddmim][NTf ₂]	38,2
[Bmim][PF ₆]	23,4
[Omim][PF ₆]	30,9
[Ddmim][PF ₆]	27,6
[Emim][BF ₄]	16,1
[Bmim][BF ₄]	17,1
[Omim][BF ₄]	19,8
[Ddmim][BF ₄]	11,6
[N ₁₁₁₄][NTf ₂]	42,3
[N ₁₈₈₈][NTf ₂]	39,1
Tampon citrat	100

Salvador ș.a au observat că activitatea celulozei din *Aspergillus niger* a scăzut odată cu creșterea concentrației de [Bmim]Cl, iar la 20% lichid ionic aceasta a fost mai scăzută cu 50% decât activitatea inițială. La presiunea de 200 MPa respectiv 400 MPa, activitatea reziduală a celulozei a fost mai mare decât activitatea obținută la presiune atmosferică [139]. Stabilitatea, activitatea, și selectivitatea enzimei sunt puternic afectate de natura lichidului ionic, însă acestea pot fi menținute prin alegerea cationului sau anionului corespunzător [133].

I.5.2.4. Metode biologice de pretratare

Metodele biologice folosesc diverse microorganisme pentru degradarea ligninei, hemicelulozei sau polifenolilor din materialul lignocelulozic [91]. *Biodelignificarea* reprezintă degradarea ligninei sub acțiunea microorganismelor [93].

Principalele dezavantaje ale acestei metode sunt:

- viteza foarte mică de hidroliză;
- derivații ligninei pot intoxica microorganismele [93];

Enzimele folosite pentru delignifierea biomasei sunt: lignin-peroxidazele, polifenol-oxidazele, lacazele, etc. Se cunosc diferite microorganisme care produc aceste enzime: *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Dichmitus squalens*, *Rigidosporus lignosus*, and *Jungua separabilima* [91].

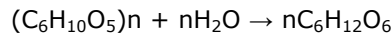
Metodele biologice de pretratare a biomasei se pot combina cu cele chimice. Fiecare dintre aceste procedee combinate prezintă avantaje și dezavantaje din punct de vedere al costurilor, randamentelor, gradului de degradare a materiei prime și a produșilor nedorți (formați). Alegerea variantei de pretratare influențează costul și performanțele etapelor ulterioare de hidroliză și fermentare [91, 93].

I.5.3. Hidroliza enzimatică a celulozei

Se cunosc două metode de hidroliză:

- hidroliza acidă (acid sulfuric, acid azotic și acid clorhidric)
- hidroliza enzimatică [83, 93, 94, 140]

În etapa de hidroliză celuloza este scindată în glucoză [93]:



Se cunosc două variante de hidroliză acidă: cu acid diluat sau cu acid concentrat. Metoda de hidroliză chimică a celulozei este dezavantajoasă datorită riscului ridicat de a degrada zaharurile în timpul hidrolizei cu obținerea unor produși secundari (furfurali, hidroxibenzaldehidă, acetati), efectului inhibitor al produșilor secundari asupra microorganismelor folosite în procesul de fermentație, necesității utilizării unor reactoare rezistente la coroziune, caracterului toxic și coriziv al acizilor folosiți, necesității de neutralizare a acidului, crescând costurile de proces [93, 141].

Înlocuirea hidrolizei acide a celulozei (care are loc la temperaturi ridicate de 90-150°C sau la concentrații mari de acid de 30-70%) cu cea enzimatică a permis obținerea unor randamente de hidroliză mai mari în condiții de reacție mult mai blânde (pH 4,8 și 40-50°C) și nu se obțin produși secundari [93]. Înlocuirea hidrolizei acide a celulozei cu hidroliza enzimatică a reprezentat prima aplicație a enzimelor în procesul de obținere a bioetanolului din biomasa lignocelulozică [93].

În Tabelul I.7 sunt prezentate condițiile și performanțele hidrolizei acide și enzimatică [93].

Tabelul I.7. Analiza comparativă a celor trei metode de hidroliză a celulozei [93]

Metodă	Agent de hidroliză	Temperatură (°C)	Timp de reacție	Randamentul de hidroliză (%)	Impact asupra mediului
Hidroliză cu acid diluat	< 1% H ₂ SO ₄	215	3 minute	50-70	DA
Hidroliză cu acid concentrat	30-70% H ₂ SO ₄	40	2-6 ore	90	DA
Hidroliză enzimatică	Celulaze	40-50	1,5 zile	75-95	NU

Hidroliza enzimatică poate avea loc pe două căi: în prezența enzimelor comerciale sau în prezența microorganismelor care produc enzime [93]. Celulazele, care sunt enzimele ce hidrolizează celuloza din biomasă pot fi produse de diferite microorganisme aerobe sau anaerobe: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* și *Streptomyces*. *Trichoderma reesei* a fost considerat cel mai eficient microorganism în producerea de celulaze [93].

Caracteristicile structurale ale biomasei lignocelulozice (cristalinitate, gradul de polimerizare al celulozei, conținutul de lignină, dimensiunea substratului) influențează procesul de hidroliză enzimatică. Factorii care limitează hidroliza enzimatică sunt prezentați în Figura I.28 [140]. Produsul intermediar și final al hidrolizei, celobioza și glucoza, inhibă activitatea celulazelor. Acest lucru poate fi evitat, prin introducerea unor cantități suplimentare de enzime sau eliminarea

produsului, imediat după formare, prin ultrafiltrare sau prin fermentare simultană în același reactor [140].

Când hidroliza enzimatică are loc *in vitro* au loc trei procese:

- transformarea fizică și chimică a celulozei;
- *hidroliza primară* care presupune eliberarea de oligomeri solubili;
- *hidroliza secundară* care presupune transformarea oligomerilor în compuși cu masă moleculară mai mică, urmată de formarea glucozei [142].

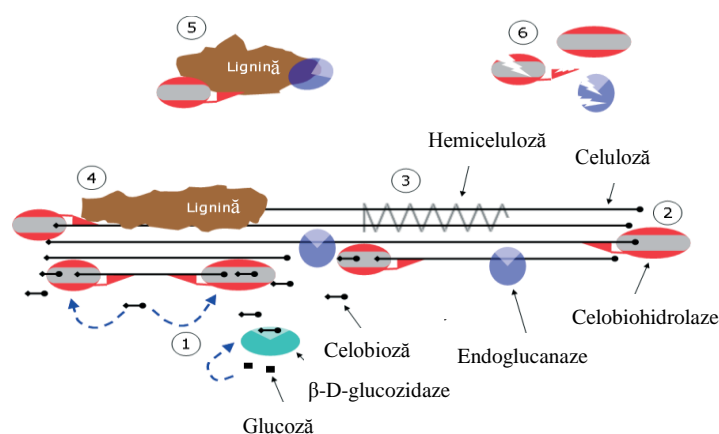


Figura I.29. Factorii care limitează hidroliza enzimatică [140]

- (1) inhibiția β -D-glucozidazelor și celobiohidrolazelor de produși (glucoză și celobioză)
- (2) structura celulozei poate împiedica acțiunea celobiohidrolazelor asupra substratului
- (3) hemiceluloza poate împiedica accesul celulozei la substrat
- (4) lignina poate împiedica accesul celulozei la substrat
- (5) celulozele pot fi adsorbite pe lignină

Pentru îmbunătățirea eficienței de hidroliză, a fost necesară introducerea unei etape de pretratare (pentru îndepărtarea rețelei lignină-hemiceluloză). În cazul în care hidroliza are loc fără pretratare, randamentul este de aproximativ 20%, în timp ce după pretratarea materiei prime randamentul a crescut la 90% [83, 93].

S-a descoperit că în timpul hidrolizei enzimaticice au loc modificări morfologice ale fibrelor din biomasă (tăierea, exfolierea, divizarea sau eroziunea fibrelor). Clarke ș.a. au analizat modificările structurale ale celulozei din lemnul de esență moale care apar în timpul hidrolizei enzimaticice, catalizată de un amestec de Novozym 188 și Celluclast 1.5L. Cantitatea de zahăr eliberată în timpul reacției a crescut până la 24 ore la 1 g zahăr/g biomasă (cantitatea ce biomasă introdusă a fost de 2%), după care a rămas constantă, probabil datorită inactivării celulozei în timpul hidrolizei. Rezultatele au arătat că după numai o oră de hidroliză enzimatică s-a produs scindarea fibrelor, iar procesul de scindare a continuat și după 6 ore (Figura I.30). Lungimea fibrelor a scăzut semnificativ după 9 ore de hidroliză, de la 2,4 mm la 0,2 mm [143].

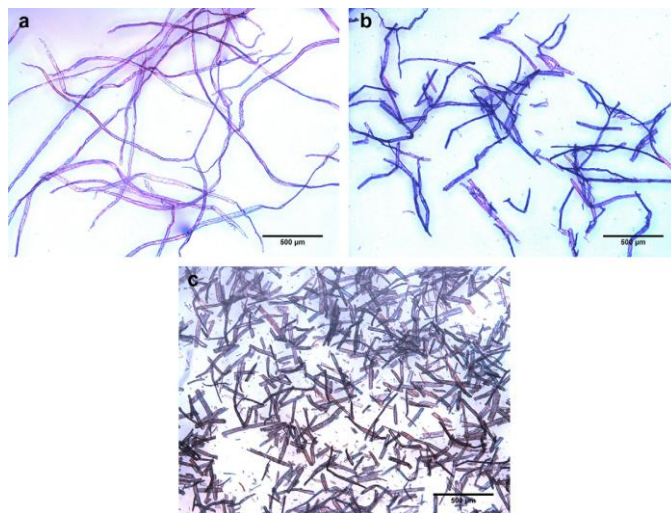


Figura I.30. Imaginea determinată la microscopul cu lumină (ML) a (a) fibrelor de biomasă, (b) după 1 oră de hidroliză enzimatică a fibrelor, (c) după 6 ore de hidroliză enzimatică a fibrelor [143]

S-a studiat hidroliza enzimatică a tulpinilor de floarea soarelui pretratate cu apă caldă și prin expandare cu aburi, catalizată de complexul celulazic Celluclast 1.5L. Cantitatea cea mai mare de glucoză (de aproximativ 27 mg/ml) obținută prin hidroliza biomasei pretratate cu apă caldă, s-a eliberat după 72 ore de reacție. În aceleași condiții de hidroliză (în tampon acetat de sodiu 0,05M, pH 4,8, 50°C, Celluclast 1.5L), cantitatea de glucoză eliberată, în urma hidrolizei biomasei pretratate prin expandare cu abur, a fost de aproximativ 43,7 mg/ml [144].

Hidroliza poate fi îmbunătățită prin adăugarea unor surfactanți sau aditivi în reacție (albumină serică BSA, polietilenglicol PEG, TWEEN sau etilenoxid), sau prin utilizarea unui amestec de celulaze provenite de la diferite microorganisme sau a altor enzime, cum este de exemplu pectinaza. Utilizarea surfactantului TWEEN sau a aditivului PEG în reacție a determinat creșterea randamentului de hidroliză a molidului pretratată prin expandare cu aburi, posibilitatea de operare la temperaturi mai ridicate de 50°C și reducerea timpului de hidroliză [145, 146]. Börjesson ș.a. au studiat influența aditivului PEG 4000 și unor surfactanți (monoalchil eter de tetraetilen glicol C₉₋₁₁EO₄, monoalchil eter de hexaetilen glicol C₉₋₁₁EO₆, N-decanoil-N-metil-D-glutamină MEGA10) asupra hidrolizei enzimatică a molidului pretratată prin expandare cu aburi, catalizat de un amestec de Celluclast 1.5L și Novozym 188. Adăugarea surfactanților la hidroliză a determinat creșterea conversiei celulozei de la 47% (fără surfactanți) la 61% prin adăugarea C₉₋₁₁EO₄, la 67% prin adăugarea de C₉₋₁₁EO₆, și la 65% prin adăugarea de MEGA10. Randamentul de hidroliză a celulozei din biomasa pretratată a crescut odată cu creșterea temperaturii de hidroliză (în intervalul 15-45°C). Prin adăugarea aditivului PEG 4000 în reacție, randamentul de hidroliză, calculat după 16 ore, a fost mai mare decât atunci când hidroliza s-a desfășurat fără adăugare de aditiv, pe tot intervalul de temperatură studiat. La temperatura de reacție de 45°C conversia celulozei a crescut de la 40% (fără aditiv) la 60% la adăugarea de PEG 4000 [146]. Hidroliza enzimatică a plopului pretratată cu microorganismele *Ceriporiopsis subvermisporea* și *Postia placenta* care degradează lignina, a fost studiată de Giles ș.a. Conversia biomasei la

glucoză a crescut în urma pretratării, de la 5,5% (pentru biomasa netratată) la 11% pentru biomasa pretrată cu *Ceriporiopsis subvermispora* și *Postia placenta* și la 7,5% pentru biomasa pretrată cu *Postia placenta* și *Ceriporiopsis subvermispora* [147]. Randamentul de hidroliză al celulozei din paiete de porumb pretratate cu FeCl_3 (la temperatura de pretratare de 160°C , 20 minute) catalizată de Celluclast 1.5L și Novozym 188, la 50°C în tampon acetat de sodiu pH 4,8, calculat după 72 ore, a crescut (în cazul paietelor de porumb netratate) de la 22% la 98%. Cantitatea de enzimă introdusă influențează hidroliza enzimatică a celulozei. Creșterea cantității de enzimă de la 15 la 30 U/g celulază a determinat creșterea randamentului de hidroliză al biomasei pretratate cu FeCl_3 , de la 33% la 74,2% [148]. Maeda ș.a. au investigat hidroliza enzimatică a paietelor din trestie de zahăr pretratate cu NaOH, catalizată de complexul comercial enzimatic Multifect® și celulele din *Penicillium funiculosum* și *Trichoderma harzianum*. Când hidroliza a fost catalizată de 25 U/g, respectiv 12,5 U/g Multifect®, cantitatea de glucoză eliberată după 18 ore de reacție a fost de 12,89 mg/ml și de 9,08 mg/ml. 25 U/g celulază din *Penicillium funiculosum* a produs, după 18 ore de hidroliză, 16,7 mg/ml glucoză, iar 25 U/g celulază din *Trichoderma harzianum* a produs, după 18 ore, aproximativ aceeași cantitate de glucoză eliberată de 25 U/g Multifect®, de 12,24 mg/ml. Cantitatea de glucoză eliberată a crescut când reacția a fost catalizată de amestecul de enzime 12,5 U/g Multifect® și *Penicillium funiculosum*, respectiv de amestecul 12,5 U/g Multifect® și *Trichoderma harzianum*, la aproximativ 18,9 mg/ml și 18,42 mg/ml [149].

Lin ș.a au investigat hidroliza enzimatică a biomasei artificiale (conține celuloză microcristalină, hemiceluloză și lignină standard) catalizată de două enzime: ACCELERASE 1500 (un complex enzimatic format din hemicelulaze, celulaze și β -D-glucozidaze) și de OPTIMASH™ BG (xilânaze). S-a observat că hemiceluloza a fost hidrolizată mai repede decât celuloza în primele 24 ore. Prin creșterea timpului de hidroliză la 48 și 72 ore, randamentul de hidroliză al celulozei a fost aproximativ același cu al hemicelulozei (de aproximativ 80%). Aceasta se explică prin faptul că enzimele acționează mai repede asupra hemicelulozei deoarece aceasta se găsește în stare amorfă, în timp ce celuloza este cristalină. Nu s-au observat interacțiuni între hemiceluloză și celuloză în timpul hidrolizei enzimatică. Pentru a urmări efectul ligninei asupra hidrolizei enzimatică a celulozei, 1% substrat care conține un amestec celuloză și lignină de diferite concentrații, s-a hidrolizat enzimatic timp de 72 ore, la 50°C . Prin creșterea cantității de lignină în amestec a scăzut cantitatea de zaharuri eliberate în timpul reacției. La un raport celuloză/lignină de 1:0, cantitatea de zaharuri eliberate a fost de aproximativ 800 mg/g substrat, iar la un raport de 1:3, această cantitate a fost de aproximativ 200 mg/g substrat [150].

Yeh ș.a au studiat efectul mărimii particulelor și ariei suprafeței asupra hidrolizei enzimatică a celulozei. Cantitatea de celobioză a crescut de 2,7 ori prin creșterea concentrației de substrat de la 2,5 la 10 mg substrat/ml. Suprafața specifică a crescut odată cu scăderea dimensiunii particulelor, de la $0,24 \text{ m}^2/\text{g}$ (aria suprafeței caracteristică celulozei nemărunțite cu mărimea particulelor cuprinsă între 1,83 și $90,13 \mu\text{m}$) la $25,50 \text{ m}^2/\text{g}$ pentru 3% celuloză MC-3-120 mărunțită timp de 120 minute cu mărimea medie a particulelor de $0,78 \mu\text{m}$. Prin creșterea ariei specifice a celulozei a crescut randamentul de hidroliză enzimatică. Creșterea mărimii particulelor celulozei a determinat scăderea cantității de celobioză eliberată în timpul hidrolizei enzimatică. La o concentrație de substrat de 2,5 mg/ml, cantitatea de celobioză eliberată a fost de $0,17 \text{ mg/ml}\cdot\text{min}$ când dimensiunea particulelor celulozei mărunțite a fost de $0,78 \mu\text{m}$ (MC-3-120) și de $0,0143$

mg/ml·min pentru celuloza nemărunțită. Randamentul de hidroliză al celulozei la glucoză, calculat după 120 ore pentru un raport enzimă/substrat 0,04, a crescut de la aproximativ 30% pentru celuloza nemărunțită (1,83-90,13 μm) la 60% pentru celuloza MC-3-120 mărunțită timp de 120 minute de 0,78 μm [151]. Raportul enzimă/substrat nu trebuie să aibă o valoare foarte mare, pentru a evita inhibarea enzimei [93]. Randamentul de hidroliză al celulozei microcristaline a crescut de la aproximativ 14,22% pentru un raport enzimă/substrat de 0,02 la 31,26% pentru un raport 0,04, respectiv la 40,29% pentru un raport de 0,06 [151].

Samaniuk ș.a. au studiat efectul agitării mecanice în timp asupra randamentului de hidroliză enzimatică a celulozei. Creșterea vitezei de amestecare (25-100 rpm) nu a determinat creșterea randamentului de hidroliză al celulozei. Cele mai mari randamente de hidroliză s-au obținut atunci când viteza de amestecare a fost mică și timpul de reacție mai lung. La 2400 sec de amestecare și 25 rpm, conversia celulozei a fost de 10%, iar la 100 rpm conversia a fost de aproximativ 9%. La 1200 sec de amestecare și 25 rpm randamentul de hidroliză a fost de aproximativ 7% [152].

I.5.3.1. Influența caracteristicilor peretelui celular asupra hidrolizei

Hidroliza enzimatică a biomasei lignocelulozice este influențată de structura materiei prime, de caracteristicile peretelui celular, de condițiile de hidroliză, incluzând și amestecul de enzime și nu în ultimul rând de pretratamentul aplicat [153].

Structura biomasei influențează accesul enzimei asupra materialului celulozic [101, 153].

Caracteristicile peretelui celular care influențează gradul de hidroliză sunt:

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

1. Mărirea particulelor/ aria suprafeței specifice

Eficiența zaharificării enzimatică depinde mult de contactul dintre enzimă și substrat. Teoretic, viteza hidrolizei enzimatică 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 hidroliză.

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. Pretratarea nu reduce numai mărirea particulelor, ci modifică și alte caracteristici ale substratului, facilitând astfel procesul de fermentare [101, 153].

2. Cristalinitatea celulozei

Structura cristalină a celulozei are un efect puternic asupra zaharificării enzimatică. 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. 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. S-a arătat că prin creșterea cristalinității, gradul de hidroliză scade. Alte studii au ajuns în schimb la concluzia că eficiența zaharificării nu este influențată de cristalinitate [101, 153].

3. Reactivitatea celulozei

S-a arătat că gradul de hidroliză scade în timp. Introducerea unor noi cantități de enzime accelerează hidroliza enzimatică, dovedind că nu are loc o modificare a reactivității substratului în timpul hidrolizei, ci enzimele hidrolitice blochează suprafața substratului. Acest fapt duce la concluzia că în timpul hidrolizei nu are loc o scădere a reactivității substratului [101].

4. Gradul de polimerizare

Gradul de polimerizare este definit ca numărul total al resturilor glicozidice de pe un lanț de celuloză. 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. Celobiohidrolazele au o activitate ridicată pe substraturile cu grad de polimerizare scăzut [153].

5. Conținutul de lignină

Conținutul de lignină al biomasei lignocelulozice afectează eficiența zaharificării enzimatice. Enzimele hidrolitice sunt adsorbite pe lignină, 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. Lignina se aglomerează în globuri/particule mici, care sunt atașate de peretele celular [101].

1.6. Concluzii

Bioetanolul este unul dintre cei mai importanți biocombustibili, deoarece folosirea sa reprezintă una din cele mai eficiente căi de reducere a emisiilor de gaze cu efect de seră și a consumului de benzină folosit la transporturile rutiere. La ora actuală, bioetanolul obținut din materii prime amidonoase se produce la scară industrială. În ultimii ani s-a îndreptat atenția asupra obținerii bioetanolului din reziduuri lignocelulozice, astfel având loc valorificarea deșeurilor de biomasă și creșterea producției de biocombustibil. Deoarece procesul de obținere a etanolului din materiale lignocelulozice este complex și costisitor, producerea bioetanolului celulozic se găsește încă la nivel de laborator și pilot. Bioetanolul se poate obține prin fermentația soluției de zaharuri fermentescibile rezultate în urma hidrolizei polizaharurilor din biomasă. Înlocuirea hidrolizei acide a celulozei cu cea enzimatică a fost benefică pentru procesul de obținere a etanolului deoarece utilizarea enzimelor pentru scindarea celulozei permite obținerea unor randamente de

hidroliză mai mari în condiții mai blânde de reacție, fără formarea de produși secundari, fără degradarea zaharurilor, respectiv costuri de producție mai mici.

Pentru îmbunătățirea cantității de zaharuri fermentescibile din celuloza din biomasă prin îndepărtarea hemicelulozei și ligninei, a fost necesară introducerea unei etape de pretratament a materialului lignocelulozic. Procedul ideal de pretratament presupune creșterea reactivității celulozei, a randamentului de recuperare al pentozelor sau hexozelor, împiedicarea formării inhibitorilor și nu permite formarea de reziduuri solide. S-au elaborat o serie de metode fizice (mărunțire, măcinare), chimice (acidă, alcalină), fizico-chimice (microunde, solvenți organici, lichide ionice) sau metode combinate de pretratament care au determinat valorificarea reziduurilor (de exemplu glicerina reziduală), delignifierea biomasei, scăderea cristalinității celulozei și îmbunătățirea randamentului de hidroliză.

Recent, lichidele ionice s-au investigat în pretratamentul materialului lignocelulozic datorită capacității ridicate a unora de a dizolva celuloza fără degradarea ei, celuloza putând fi ușor regenerată cu apă, capacității de a dizolva lignina din biomasă, stabilității lor termice și chimice, toxicității reduse, posibilității de recuperare ușoară și de reutilizare a lichidelor ionice într-o nouă etapă de pretratament astfel scăzând costurile de producție. Utilizarea lichidelor ionice în amestec cu diferiți solvenți organici sau săruri determină creșterea capacității de dizolvare a celulozei și ligninei.

Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă lignocelulozică se poate efectua cu ajutorul unui complex celulozic obținut din diferite microorganisme (*Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Aspergillus niger*, etc). Pentru îmbunătățirea performanțelor catalitice a celulelor s-a realizat imobilizarea enzimelor prin adsorbție, legare covalentă, entrapare etc. Producția la scară industrială a bioetanolului poate fi favorizată de folosirea celulelor imobilizate, deoarece în urma imobilizării celulele prezintă stabilitate ridicată, posibilitatea de separare din amestecul de reacție, posibilitatea de modelare a proprietăților catalitice, prevenirea infectării microbiene și posibilitatea de reutilizare, astfel crescând cantitatea de zaharuri fermentescibile.

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au urmărit îmbunătățirea eficienței hidrolizei enzimatică a celulozei prin pretratamentul biomasei lignocelulozice prin diferite metode simple sau combinate, optimizarea pretratamentului cu DMSO/[Emim]Ac pentru recuperarea celulozei și ligninei dizolvate și reutilizarea solventului, îmbunătățirea performanțelor catalitice ale celulei prin imobilizarea enzimei prin tehnica entrapării în sol-gel, studiul stabilității celulei imobilizate, hidroliza enzimatică a celulozei microcristaline și regenerate utilizând celuloza imobilizată, studiul cinetic al reacției de hidroliză enzimatică a celulozei microcristaline Avicel PH101 utilizând celuloza nativă și imobilizată, creșterea cantității de zaharuri fermentescibile prin reutilizarea celulei imobilizate pe substrat de celuloză.

II. CONTRIBUȚII ORIGINALE

II.1. Principalele obiective științifice

Obținerea bioetanolului celulozic din reziduuri lignocelulozice a fost din ce în ce mai studiată în ultimul timp, datorită unor avantaje majore cum ar fi valorificarea deșeurilor de biomasă și creșterea producției de biocombustibil. Pentru scăderea costurilor de proces, este necesară elaborarea unor procedee cât mai simple și eficiente pentru fiecare etapă de obținere a bioetanolului celulozic. În acest scop, principalele obiective științifice urmărite au fost:

- Creșterea cantității de zaharuri fermentescibile produse în urma hidrolizei enzimatică a celulozei și hemicelulozei din biomasă. În acest scop, s-a propus îmbunătățirea eficienței hidrolizei enzimatică a celulozei prin pretratarea materialului lignocelulozic. S-au studiat și s-au comparat diferite metode simple sau combinate de pretratare: metoda de pretratare cu acid sulfuric diluat, metoda de pretratare cu glicerină pură sau reziduală, metoda de pretratare cu lichide ionice, metoda combinată de pretratare cu acid sulfuric diluat/lichid ionic, metoda combinată de pretratare cu glicerină/lichid ionic și metoda de pretratare cu lichid ionic/solvent organic dimetilsulfoxid. De asemenea, s-a studiat influența metodelor de pretratare asupra tipului de lemn testat: lemn de esență tare (plop, stejar), respectiv lemn de esență moale (brad, salcâm).

- Dizolvarea celulozei și ligninei din biomasa de plop în amestec de dimetilsulfoxid/lichid ionic [Emim]Ac, recuperarea celulozei și ligninei dizolvate și reutilizarea solventului. Pentru a împiedica degradarea celulozei și modificarea structurii lichidului ionic s-au ales condițiile optime de dizolvare (temperatura, timpul optim de operare și concentrația optimă de dimetilsulfoxid/lichid ionic). Celuloza regenerată și lignina precipitată din soluția de DMSO/[Emim]Ac au fost caracterizate prin spectroscopie FT-IR.

- Imobilizarea celulozei prin tehnica entrapării în sol-gel, pentru îmbunătățirea performanțelor catalitice. S-a recurs la imobilizarea prin tehnica sol-gel, deoarece comparativ cu alte metode aceasta prezintă o serie de avantaje: poate fi aplicată unui domeniu larg de enzime, inactivarea enzimei este redusă, flexibilitatea dimensiunii și geometriei porilor, se poate imobiliza o cantitate mare de proteină [38]. Celuloza s-a imobilizat prin două metode de entrapare în sol-gel utilizând diferiți aditivi și amestecuri de doi sau trei silani precursori alchil, aril-trimetoxisilani în amestec cu tetrametoxisilan.

- Evaluarea performanțelor preparatelor imobilizate prin determinarea randamentului de imobilizare, activității catalitice și randamentului de regăsire al activității. Metoda care a determinat obținerea celui mai eficient preparat celulozic s-a optimizat prin modificarea raportului silanilor precursori și a cantității de enzimă introdusă la imobilizare. Preparatul care a înregistrat cea mai bună activitate (testată pe carboximetilceluloză) și a fost cel mai eficient în reacția de hidroliză enzimatică a celulozei microcristaline a fost folosit în studiile de stabilitate și reutilizare.

- S-au studiat efectele pH-ului mediului de reacție, temperaturii, concentrației de produs, asupra activității catalitice a celulozei nativă și imobilizată, precum și stabilitatea la depozitare și la menținere în soluție apoasă. S-a studiat și influența lichidelor ionice asupra activității celulozei native și imobilizate.

- Studiul hidrolizei enzimatică a celulozei microcristaline Avicel PH101, celulozei Avicel PH101 regenerată din DMSO/[Emim]Ac (pretrată) și a celulozei din plop utilizând celuloza imobilizată. Pentru a stabili efectele imobilizării celulozei în matrici de sol-gel asupra accesului substratului în situsul catalitic și implicit vitezei de formare a produsului s-a studiat cinetica reacției de hidroliză enzimatică celulozei Avicel PH101 utilizând celuloza nativă și celuloza imobilizată.

- Reutilizarea celulozei imobilizate utilizând ca substrat celuloza, astfel crescând cantitatea de zaharuri fermentescibile eliberate în timpul reacției de hidroliză enzimatică. Reutilizarea preparatului celulozic s-a realizat pe două substraturi: celuloza microcristalină Avicel P101 (netratată) și celuloza Avicel PH101 pretrată cu DMSO/[Emim]Ac.

II.2. Pretratarea biomasei lignocelulozice prin metode neconvenționale

Materialul lignocelulozic ce conține biomasa ierboasă și biomasa lemnoasă din lemnul de esență tare și lemnul de esență moale are în compoziție o combinație de celuloză, hemiceluloză și lignină. Reziduurile ierboase din agricultură (spice de grâu, tulpini de porumb), silvicultură (rumeguș, așchii), deșeurile municipale (hârtie, carton), diverse deșeuri industriale, precum și plantele fibroase și lemnoase sunt considerate o sursă abundentă și ieftină de celuloză și hemiceluloză (reprezintă aproximativ 70% din biomasă). Celuloza și hemiceluloza au în compoziția lor zaharuri fermentescibile (în special glucoză și xiloză) și sunt considerate materii prime pentru obținerea bioetanolului celulozic.

Lignina, neavând în compoziția sa zaharuri, nu poate fi folosită la obținerea bioetanolului. Compoziția lemnului de esență tare și lemnului de esență moale a fost prezentată în Tabelul I.1.

Pentru a distruge piedicile structurale și de compoziție (datorită prezenței ligninei) ce pot fi implicate în procesul de hidroliză, precum și de a îmbunătăți accesul enzimei la celuloză și de a mări randamentul de obținere a zaharurilor fermentescibile a fost necesară introducerea etapei de pretratare a biomasei lignocelulozice în procesul de obținere a bioetanolului.

În acest capitol s-a studiat influența diferitor metode simple sau combinate de pretratare asupra hidrolizei enzimatică a celulozei din 4 tipuri de biomasă lignocelulozică: două de tip lemn de esență tare (stejar și plop) și două de tip lemn de esență moale (brad și salcâm).

II.2.1. Determinarea conținutului total de lignină și hidrați de carbon din biomasa lignocelulozică

Conținutul în hidrați de carbon este un factor extrem de important în procesul de obținere a bioetanolului din materii prime lignocelulozice. Hidrații de carbon rezultă atât în timpul pretratamentului, în special ca urmare a hidrolizei hemicelulozei, cât și în timpul etapei de hidroliză enzimatică a celulozei. Produsul principal al hidrolizei hemicelulozei este xiloza, iar în urma hidrolizei celulozei rezultă glucoza. Alte zaharuri care mai pot fi prezente sunt arabinoza dintre pentoze, galactoza și manoza dintre hexoze.

S-a determinat conținutul total în hidrați de carbon și lignină din cele patru tipuri de lemn studiate (salcâm, stejar, plop și brad) [154], prin hidroliza acidă a lemnului măcinat și uscat (metoda a fost descrisă la paragraful III.2.2.1). Analiza hidraților totali de carbon, exprimați ca glucoză echivalentă, s-a efectuat prin

metoda chimică cu acid 3,5-dinitrosalicilic (conform metodei descrise la paragraful III.3.4). Conținutul total de lignină din biomasa lignocelulozică s-a determinat prin metoda descrisă la paragraful III.3.3.

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 și s-a calculat un factor de corecție care să fie aplicat probelor de rumeguș. Pornindu-se de la 300 mg rumeguș uscat, 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, înseamnă că randamentul de regăsire este:

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

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

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 rumeguș este 1,17 [155].

În Tabelul II.1, sunt prezentate rezultatele conținutului total de zaharuri și conținutului total de lignină din probele de rumeguș studiate.

Tabelul II.1. Conținutul total de hidrați de carbon și lignină din biomasa lignocelulozică

Biomasă	Lignină din biomasă (%)			Conținut total de zaharuri (%)	Cenușă (%)
	ASL ^a (%)	AIL ^b (%)	LT ^c (%)		
Brad	1,46	28,84	30,32	66,65	1,05
Salcâm	3,21	26,67	29,88	68,71	0,41
Stejar	0,58	21,40	21,98	74,55	2,25
Plop	1,45	17,04	18,49	78,48	2,05

^a Lignină solubilă în acid

^b Lignină insolubilă în acid

^c Lignină totală din biomasă

II.2.2. Influența metodei de pretratare a biomasei lignocelulozice asupra hidrolizei enzimaticice

II.2.2.1. Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretrată cu acid sulfuric diluat

Pentru a facilita accesul complexului celulozic la celuloza din lemn, biomasa măcinată și uscată s-a pretratată cu acid sulfuric diluat, acesta având rolul de a hidroliza parțial sau total hemiceluloza la zaharuri fermentescibile, în special xiloză.

Pretratarea celor patru tipuri de biomasă lignocelulozică cu acid sulfuric diluat s-a realizat prin menținerea a 300 mg rumeguș măcinat și uscat în 3 ml acid

sulfuric 0,82% la 150°C, timp de 30 minute [156]. Metoda de pretratament cu acid sulfuric diluat a fost descrisă la paragraful III.2.2.1. Biomasa pretrată și netratată s-a hidrolizat enzimatic utilizând celuloza nativă Celluclast 1.5L. Pe tot parcursul reacției de hidroliză s-au prelevat probe, iar conținutul total de zaharuri reducătoare eliberate, exprimate ca glucoză echivalentă, s-a determinat prin metoda cu acid 3,5-dinitrosalicilic descrisă la paragraful III.3.4.

În Tabelul II.2 și Tabelul II.3, sunt prezentate conținuturile totale de zaharuri reducătoare pentru cele patru probe de rumeguș pretratate cu acid sulfuric diluat și netratate, determinate în urma reacției de hidroliză a 100 mg rumeguș cu 5 μl/ml celuloză nativă Celluclast 1.5 L în 10 ml tampon acetat pH=4,8, la 40°C.

Tabelul II.2. Conținutul total de zaharuri din probele de rumeguș netratat

Timp (ore)	Concentrație totală de zaharuri (mg/ml)				Randament de hidroliză ^a (%)			
	Brad	Salcâm	Stejar	Plop	Brad	Salcâm	Stejar	Plop
2	2,23	1,29	1,52	1,39	33,16	18,77	20,39	18,66
4	3,28	2,08	2,14	1,66	49,21	30,27	28,70	22,29
6	3,34	2,3	2,45	2,05	50,11	33,47	32,86	27,52
8	4,04	2,98	2,66	2,62	60,61	43,37	35,68	35,18
24	4,39	3,98	2,90	3,71	65,98	57,92	38,90	49,70

^a raportat la cantitatea totală de zaharuri din 100 mg rumeguș supus hidrolizei (%)

Tabelul II.3. Conținutul total de zaharuri din probele de rumeguș pretratate cu acid sulfuric diluat

Timp (ore)	Concentrație totală de Zaharuri (mg/ml)				Randament de hidroliză ^a (%)			
	Brad	Salcâm	Stejar	Plop	Brad	Salcâm	Stejar	Plop
2	1,41	1,83	1,44	1,61	22,75	30,59	20,29	21,41
4	2,24	2,59	2,27	2,62	36,14	43,29	31,98	38,85
6	3,07	3,40	2,80	3,37	49,51	56,83	39,45	44,84
8	3,36	3,84	2,89	3,84	54,21	64,19	40,72	51,08
24	3,98	4,14	3,79	5,15	58,36	69,20	53,40	68,70

^a raportat la cantitatea totală de zaharuri din 100 mg rumeguș supus hidrolizei (%)

Pentru studiul capacității acidului sulfuric de a hidroliza hemiceluloza din biomasă s-a determinat conținutul total de zaharuri reducătoare (exprimate ca glucoză) din filtratul rezultat după pretratamentul cu acid diluat. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul II.4.

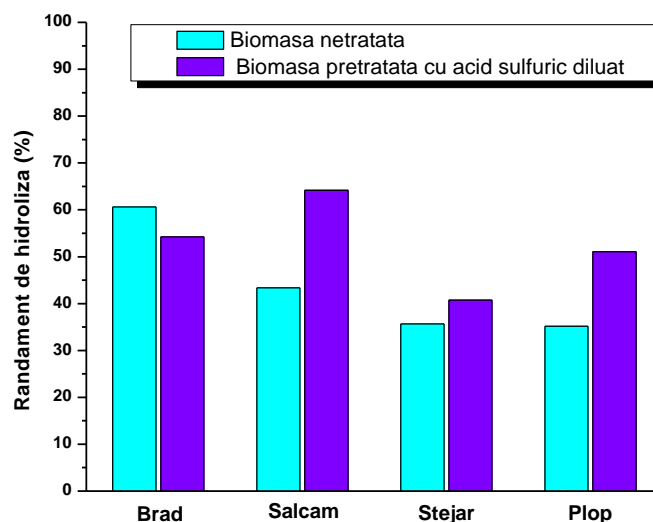
Tabelul II.4. Conținutul total de hidrați de carbon din soluțiile obținute după pretratamentul cu acid sulfuric

Biomasă	Cantitate totală de zaharuri în filtrat ^a (mg)	Randament de hidroliză ^b (%)
Brad	78,28	26,09
Salcâm	77,38	25,79
Stejar	46,78	20,92
Plop	47,14	19,32

^a Volumul total de filtrat a fost de 20 ml; Cantitatea totală de rumeguș supusă pretratamentului a fost de 300 mg

^b raportat la cantitatea totală de zaharuri din 300 mg rumeguș supus pretratării (%)

Pentru a ilustra mai bine influența pretratamentului cu acid sulfuric diluat s-a realizat Figura II.1 care prezintă efectul metodei de pretratare cu acid sulfuric diluat asupra randamentului de hidroliză a celulozei din biomasa lignocelulozică, calculat după 8 ore de reacție .

**Figura II.1.** Efectul pretratamentului cu acid sulfuric diluat asupra hidrolizei enzimatice a celulozei din biomasa lignocelulozică, după 8 ore de reacție

În urma pretratării salcâmului, plopului și stejarului cu acid sulfuric diluat, cantitatea de zaharuri eliberată a crescut pe tot parcursul reacției de hidroliză enzimatică, comparativ cu biomasa netratată (Tabelul II.2 și Tabelul II.3). Aceasta se datorează probabil accesibilității mai bune a enzimei la celuloza din biomasă după pretratare, deoarece în urma pretratamentului cu acid sulfuric s-a hidrolizat parțial hemiceluloza. O cantitate mai mare de hemiceluloză a fost hidrolizată (Tabelul II.4) din lemnul de esență moale (aproximativ 25% din salcâm, respectiv 26% din brad), comparativ cu lemnul de esență tare (aproximativ 19% plop, respectiv 21% din stejar). Pentru rumegușul de brad, cantitatea de zahăr obținută în urma hidrolizei enzimatice a celulozei din bradul pretratată a fost mai mică decât cantitatea de zahăr

eliberată din bradul netratat, deoarece în urma pretratamentului acid probabil s-a hidrolizat și o parte din celuloză. Conform Figurii II.1 randamentul de hidroliză, calculat după 8 ore de reacție, a fost mai mare atunci când la hidroliză s-a folosit lemnul de esență moale (atât la lemnul netratat, cât și la cel pretratată). În urma pretratamentului cu acid sulfuric diluat, randamentul de hidroliză, calculat după 8 ore de reacție, a fost îmbunătățit cu aproximativ 5% pentru stejar, 15% pentru rumegușul de plop, respectiv 20% pentru rumegușul de salcâm (Figura II.1).

Dintre tipurile de rumeguș pretratate, salcâmul pretratată a fost hidrolizat cu eficiența cea mai mare. După 8 ore de reacție, cantitatea de zaharuri eliberată în urma hidrolizei enzimatice a salcâmului pretratată a fost de 3,84 mg/ml (conversia celulozei a fost aproape totală, deoarece, conform datelor din literatura de specialitate [18] lemnul de esență moale conține aproximativ 33-40% celuloză), comparativ cu 2,98 mg/ml zaharuri eliberate după hidroliza salcâmului netratat.

II.2.2.2. Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretratată cu glicerină

Delignifierea lemnului se poate face în solvenți polari neapoși. Glicerina reziduală este un co-produs obținut în cantități mari la producerea biodieselului. Nu este de recomandat ca produșii nepurificați să fie utilizați în industria alimentară, cosmetică sau farmacie. Glicerina obținută de la fabricarea biodieselului este un reziduu care poate fi valorificat în viitor. De aceea, utilizarea glicerinei pentru pretratamentul biomasei poate fi importantă din punct de vedere economic.

Cele 4 tipuri de biomasă lignocelulozică (brad, salcâm, stejar, plop) s-au pretratată cu glicerină pură și reziduală [157]. Metoda de pretratată cu glicerină a fost descrisă la paragraful III.2.2.2. Glicerina reziduală folosită în acest studiu a fost produsul rezultat de la fabricarea biodieselului în laborator, în urma reacției dintre ulei de floarea soarelui, metanol și 0,5% catalizator hidroxid de sodiu [158]. Pentru a observa eficiența pretratamentului cu glicerină pură și reziduală, 10 mg/ml biomasă pretratată în tampon acetat de sodiu pH 4,8 s-a hidrolizat enzimatic, utilizând 5 μ l/ml celulaza Celuclast 1.5L.

Conținuturile totale de zaharuri reducătoare, rezultate în urma hidrolizei enzimatice a celulozei din biomasa pretratată cu glicerină pură și reziduală, sunt prezentate în Tabelul II.5 și Tabelul II.6.

Tabelul II.5. Conținutul total de zaharuri din probele de rumeguș pretratată cu glicerină pură

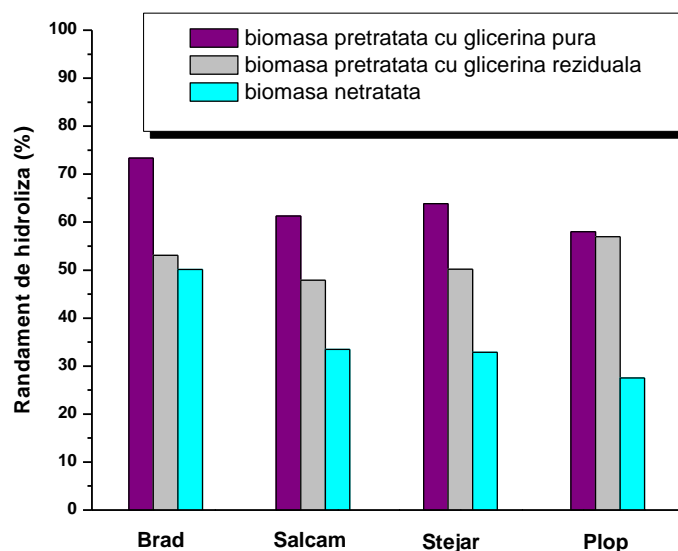
Timp (ore)	Concentrație totală de zaharuri (mg/ml)			
	Brad	Salcâm	Stejar	Plop
2	2,68	2,66	2,29	2,23
4	3,87	3,81	3,43	3,57
6	4,09	4,21	4,76	4,32
8	4,12	4,23	5,03	5,32
24	4,23	4,34	5,12	5,44

Tabelul II.6. Conținutul total de zaharuri din probele de rumeguș pretratate cu glicerină reziduală

Timp (ore)	Concentrație totală de zaharuri (mg/ml)			
	Brad	Salcâm	Stejar	Plop
2	2,12	2,34	2,22	2,14
4	3,15	3,00	3,33	3,28
6	3,54	3,29	3,74	4,24
8	4,11	4,03	5,00	5,13
24	4,19	4,25	5,13	5,40

Pe tot parcursul reacției, cantitatea de zaharuri eliberate în urma hidrolizei biomasei pretratate cu glicerină pură a fost mai mare decât cantitatea de zaharuri eliberată în urma hidrolizei biomasei pretratate cu glicerină brută, însă diferențele nu au fost foarte mari (Tabelul II.5 și Tabelul II.6).

Figura II.2 prezintă efectul pretratării biomasei cu glicerină pură și reziduală asupra eficienței de hidroliză enzimatică a celulozei din biomasa pretrată, după 6 ore de reacție. Randamentele de hidroliză (exprimate în % masă) au fost calculate pe baza cantităților de zaharuri rezultate în urma hidrolizei la diferite intervale de timp, raportate la cantitățile totale de zaharuri din tipurile de rumegușuri studiate, prezentate în Tabelul II.1.

**Figura II.2.** Efectul pretratamentului cu glicerină asupra hidrolizei enzimatică a celulozei din biomasa pretrată, după 6 ore de reacție

Pretratamentul cu glicerină pură a dus în general la viteze de hidroliză mai mari comparativ cu cea reziduală, ceea ce era de așteptat în condițiile în care glicerina reziduală conține și o serie de alți compuși, dintre care unele pot avea efect

inhibitor pentru celule. Cele mai mari diferențe s-au înregistrat în cazul rumegușului de stejar, unde pretratarea cu glicerină pură a dus la un randament de hidroliză de 63,8% după 6 ore, comparativ cu 50,2% în cazul glicerinei reziduale (Figura II.2). Trebuie însă precizat că această viteză diferită de hidroliză nu a afectat productivitatea enzimei, după 24 de ore ajungându-se la aproximativ același grad de hidroliză, așa cum rezultă din Figura II.3, în care este reprezentată evoluția în timp a reacției de hidroliză pentru rumegușul de stejar și cel de plop, la care practic nu a existat diferență între efectele pretratamentului cu glicerină pură și reziduală.

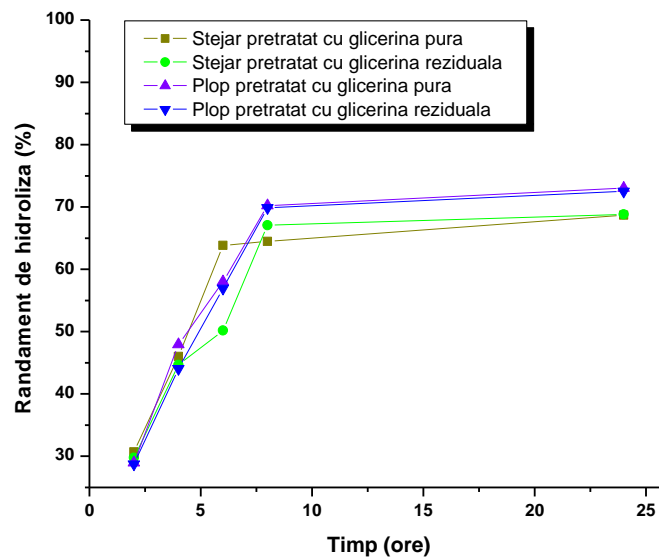


Figura II.3. Evoluția în timp a reacției de hidroliză pentru rumegușul de stejar și cel de plop pretratate cu glicerină pură și reziduală

Prin urmare, utilizarea glicerinei reziduale de la fabricarea biodieselului nu afectează productivitatea complexului enzimatic celulozic ci doar viteza reacției de hidroliză, iar această influență depinde de proveniența biomasei.

Deoarece glicerina are și capacitatea de a dizolva lignina din biomasa lignocelulozică s-a determinat cantitatea totală de lignină dizolvată în glicerina pură [159]. Metoda de analiză a ligninei dizolvată a fost prezentată la paragraful III.3.3. Conținutul total de lignină dizolvată în glicerina pură pentru fiecare tip de biomasă este prezentat în Tabelul II.7.

Tabelul II.7. Cantitatea totală de lignină dizolvată în glicerină pură

Biomasă	Cantitate totală de lignină dizolvată	
	(mg)	(%) ^a
Brad	9,70	32,01
Salcâm	8,88	29,75
Stejar	4,62	21,16
Plop	4,76	25,79

^a raportată la cantitatea totală de lignină din rumeguș.

Rezultatele arată că glicerina a fost capabilă să dizolve o cantitate mai mare de lignină din lemnul de esență moale (Tabelul II.7). Aproximativ 32%, respectiv 29% lignină din lemnul de esență moale s-a dizolvat în glicerină, comparativ cu 21%, respectiv 25% lignină din lemnul de esență tare (stejar, respectiv plop). Aceasta probabil se datorează diferențelor structurale dintre lignina din lemnul de esență tare și lignina din lemnul de esență moale, cât și faptului că lignina din lemnul de esență tare posedă structuri unite adițional, ceea ce îi conferă o rezistență mai mare la delignifiere.

Comparativ cu biomasa netratată, pretratarea celor patru tipuri de rumeguș cu glicerină pură sau reziduală a determinat creșterea eficienței hidrolizei enzimatică a celulozei din biomasă, aceasta deoarece glicerina este capabilă să îndepărteze o parte de lignină din biomasă (Tabelul II.7), accesul celulozei la substrat fiind îmbunătățit. În urma pretratării biomasei cu glicerină pură, după 6 ore de reacție, randamentul de hidroliză a crescut cu aproximativ 31% pentru rumegușul de stejar și plop, 28% pentru rumegușul de salcâm, respectiv 10% pentru rumegușul de brad (Figura II.2). În urma pretratării cu glicerină reziduală, randamentul de hidroliză a fost îmbunătățit cu aproximativ 20% pentru stejar, 30% pentru rumegușul de plop, 17% pentru salcâm, respectiv 5% pentru rumegușul de brad (Figura II.2). Dintre tipurile de biomasă pretratate cu glicerină, bradul a fost hidrolizat cu eficiența cea mai mică. Aceasta probabil se datorează faptului că deși în urma pretratării aproximativ 32% din lignină a fost dizolvată în glicerină (Tabelul II.7), rumegușul de brad conține o cantitate mai mare de lignină rămasă decât esențele tari de stejar și plop.

II.2.2.3. Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretrată cu lichid ionic

În ultimii ani, lichidele ionice au devenit atractive pentru cele mai diverse domenii datorită unor proprietăți deosebite, ca stabilitate termică, stabilitate chimică și miscibilitate cu diferiți solvenți organici sau anorganici. Datorită capacității unor lichide ionice de a dizolva celuloza și lignina din biomasă, acestea s-au folosit și la pretratarea biomasei lignocelulozice. Lichidele ionice dizolvă celuloza datorită formării la temperaturi înalte a unor legături puternice de hidrogen. Celuloza regenerată din soluția de lichid ionic, prin precipitare cu anti-solvenți, are un grad mai scăzut de cristalinitate. Pretratarea biomasei lignocelulozice cu lichide ionice este eficientă și datorită capacității acestora de a dizolva lignina, astfel accesul enzimelor la biomasa lignocelulozică este îmbunătățit. Lignina dizolvată poate fi recuperată și utilizată în diferite domenii. De asemenea acești solvenți nu sunt toxici pentru materialul lignocelulozic, pot fi reutilizați, iar caracterul inerent bazic sau acid al lichidelor ionice permite amestecarea lor cu diferiți alți solvenți sau catalizatori, scăzând astfel costurile procesului.

În acest capitol s-a studiat pretratarea a patru tipuri de rumeguș măcinat și uscat (brad, salcâm, stejar și plop) cu diferite lichide ionice. Lichidele ionice folosite pentru acest studiu au fost: tetrafluoroborat de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]BF₄), hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]PF₆), trifluoroacetat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]TFA) și acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]Ac) [157]. Pretratamentul biomasei lignocelulozice cu lichide ionice s-a realizat la un raport 50 mg biomasă/ml lichid ionic, timp de 24 ore, la temperatura de 90°C.

Metoda de pretratare a biomasei lignocelulozice cu lichide ionice este descrisă la paragraful III.2.2.3. Rumegușul pretratată s-a hidrolizat enzimatic cu

ajutorul celulozei native Celluclast 1.5L. Cantitățile totale de zaharuri reducătoare eliberate (exprimate ca glucoză echivalentă) în urma hidrolizei enzimaticе, pentru fiecare tip de biomasă, sunt prezentate în Tabelul II.8, Tabelul II.9, Tabelul II.10 și Tabelul II.11.

Tabelul II.8. Efectul naturii lichidului ionic utilizat la pretratament asupra hidrolizei enzimaticе a rumegușului de salcâm pretrat

Timp (ore)	Randament de hidroliză ^a (%)			
	[Emim][Ac]	[Emim]TFA	[Bmim]BF ₄	[Bmim]PF ₆
1	13,38	10,33	6,54	8,00
2	21,97	25,17	16,59	16,88
4	51,22	24,30	16,00	19,09
6	60,51	31,58	16,59	20,08
8	60,98	33,61	18,48	19,50
24	62,29	54,72	29,69	31,87

^a Raportat la cantitatea totală de zaharuri din rumeguș (%)

Tabelul II.9. Efectul naturii lichidului ionic utilizat pentru pretratament ionice asupra hidrolizei enzimaticе a rumegușului de brad pretrat

Timp (ore)	Randament de hidroliză ^a (%)			
	[Emim][Ac]	[Emim]TFA	[Bmim]BF ₄	[Bmim]PF ₆
1	31,95	23,70	13,50	21,30
2	46,51	42,46	24,60	45,01
3	53,11	48,16	39,60	49,96
4	60,16	53,11	49,66	54,01
6	65,26	59,71	56,11	69,75
8	65,88	63,61	60,31	70,66
24	68,75	76,81	61,36	65,11

^a Raportat la cantitatea totală de zaharuri din rumeguș (%)

Tabelul II.10. Efectul naturii lichidului ionic utilizat pentru pretratament asupra hidrolizei enzimaticе a rumegușului de stejar pretrat

Timp (ore)	Randament de hidroliză ^a (%)			
	[Emim][Ac]	[Emim]TFA	[Bmim]BF ₄	[Bmim]PF ₆
1	22,13	15,42	10,46	14,08
2	39,03	25,75	12,34	22,26
4	45,47	29,37	20,79	29,77
6	61,03	31,35	23,74	30,44
8	65,99	36,35	26,96	32,46
24	67,47	41,31	30,71	41,71

^a Raportat la cantitatea totală de zaharuri din rumeguș (%)

Tabelul II.11. Efectul naturii lichidului ionic utilizat pentru pretratament asupra hidrolizei enzimatică a rumegușului de plop pretrat

Timp (ore)	Randament de hidroliză ^a (%)			
	[Emim][Ac]	[Emim]TFA	[Bmim]BF ₄	[Bmim]PF ₆
0,5	15,03	7,51	5,35	6,37
1	29,56	15,16	9,42	10,44
1,5	22,83	18,09	12,99	16,18
2	43,96	25,73	21,03	24,20
4	58,86	33,63	28,66	30,19
6	61,92	42,43	33,00	39,37
8	61,09	42,55	35,55	40,26
24	64,85	44,72	41,15	41,02

^a Raportat la cantitatea totală de zaharuri din rumeguș (%)

Pentru a ilustra mai sugestiv evoluția în timp a hidrolizei biomasei pretratate cu diferite lichide ionice, datele din aceste tabele au fost reprezentate și în Figura II.4.

Cantitatea totală de zaharuri eliberată prin hidroliza rumegușului de plop pretrat cu [Emim]Ac, respectiv [Emim]TFA, a crescut în primele 6 ore de reacție, la aproximativ 5 mg/ml, respectiv 3 mg/ml (Figura II.4.a), după care s-a menținut aproximativ constantă. În cazul folosirii lichidului ionic [Emim]Ac, după doar 6 ore de reacție, conversia celulozei a fost maximă (în urma hidrolizei celulozei care se găsește în 10 mg/ml plop pretrat rezultă aproximativ 5 mg/ml zaharuri reducătoare). Această afirmație se bazează pe faptul că datele de literatură indică 26,6%, cantitatea totală de hemiceluloză în lemnul de plop (17,7-21,2% xilan, 0,9-1,4% arabinoză, 1,3-3,3% manoză, 1,1% galactoză) [27], iar cantitatea totală de zaharuri din plop, determinată experimental la paragraful III.2.1, a fost de aproximativ 78,48%. Diferența, care corespunde cantității de celuloză din biomasa de plop este de aproximativ 51%. Această valoare este în concordanță cu datele din literatura de specialitate, conform cărora lemnul de esență tare conține aproximativ 38-51% celuloză [18].

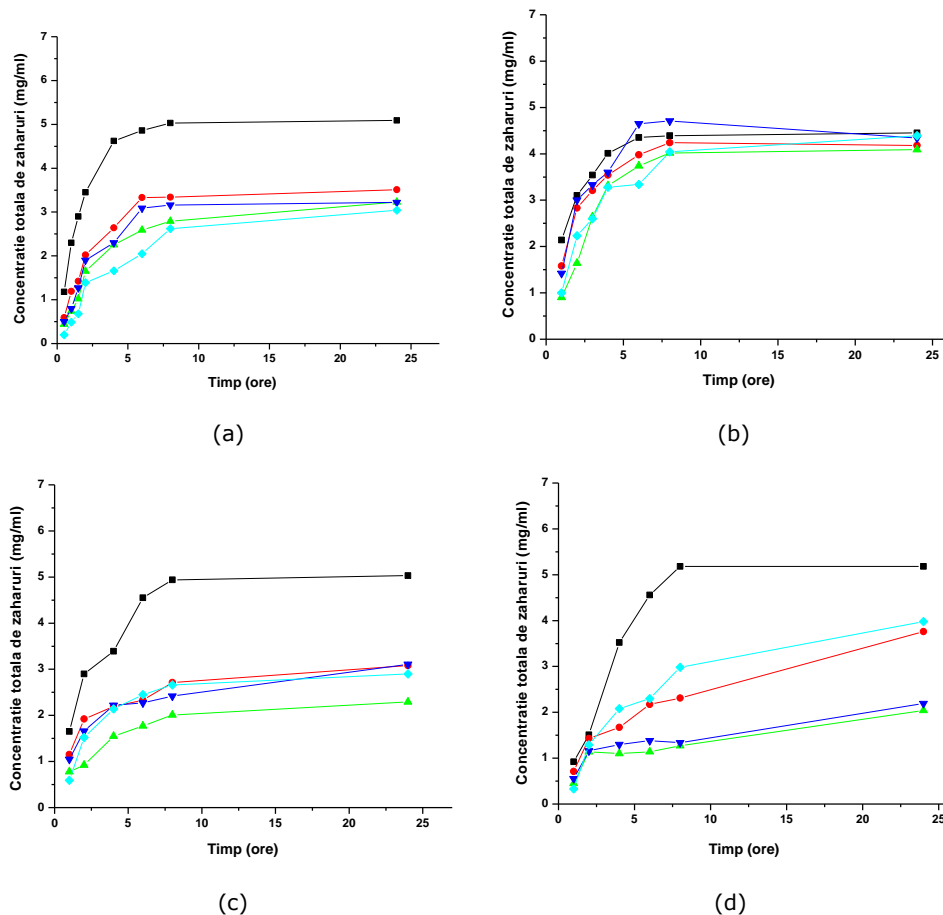


Figura II.4. Evoluția în timp a hidrolizei biomasei pretratate cu diferite lichide ionice (a) plop, (b) brad, (c) stejar, (d) salcâm
 -■- [Emim] Ac, -●- [Emim]TFA, -▲- [Emim]BF₄, -▼- [Bmim]PF₆,
 -◆- biomasa netratată

În cazul folosirii lichidului ionic [Emim]TFA, cantitatea de zaharuri eliberată a fost de 3 mg/ml după 6 ore de hidroliză, după care s-a menținut constantă, aceasta datorându-se probabil inactivării enzimei în timpul hidrolizei. Nu s-au observat diferențe semnificative ale cantităților de zaharuri eliberate în urma reacției enzimatică a plopului pretratată cu cele două lichide ionice ce conțin anionii [BF₄]⁻, respectiv [PF₆]⁻ și a plopului netratat, ceea ce înseamnă că lichidele ionice [Bmim]PF₆ și [Emim]BF₄ nu sunt eficiente la pretratarea biomasei de plop [157].

De asemenea, lichidele ionice ce conțin anionii [BF₄]⁻, [PF₆]⁻ au fost ineficiente în pretratarea stejarului, salcâmului și bradului, cantitățile de zaharuri obținute pe tot parcursul reacției, în urma hidrolizei enzimatică a acestor tipuri de biomasa pretratată fiind aproximativ aceleași, sau (în cazul stejarului și salcâmului) chiar mai mici decât cantitățile de zaharuri obținute după hidroliza biomasei netratate (Figura II.4.b,c,d). Maki-Arvela ș.a. au relatat că lichidele ionice care conțin anionii tetrafluoroborat și hexafluorofosfat nu au fost capabile să dizolve

materialul lignocelulozic [99]. În cazul rumegușului de brad (Figura II.4.b), dintre cele 4 lichide ionice folosite la pretratare, [Emim]Ac a determinat creșterea eficienței de hidroliză, comparativ cu bradul netratat.

Cantitatea de zaharuri eliberată în timpul hidrolizei bradului și salcâmului pretratată cu lichidul ionic ce conține anionul acetat a crescut până la 6 ore de reacție (Figura II.4.b,d), la 4,35 mg/ml, respectiv 4,16 mg/ml, după care a fost constantă, aceasta probabil deoarece conversia celulozei la zaharuri a fost totală (din 10 mg/ml substrat celulozic s-au obținut aproximativ 4 mg/ml zaharuri totale). Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele din literatură, conform cărora cantitatea de celuloză din lemnul de esență moale este de 33-42% [18].

Pentru a ilustra mai sugestiv influența naturii lichidului ionic asupra randamentului hidrolizei enzimatică a biomasei pretratate s-a realizat Figura II.5, pe baza datelor din Tabelul II.8, Tabelul II.9, Tabelul II.10, Tabelul II.11 și Tabelul II.2, la timp de reacție de 4 ore.

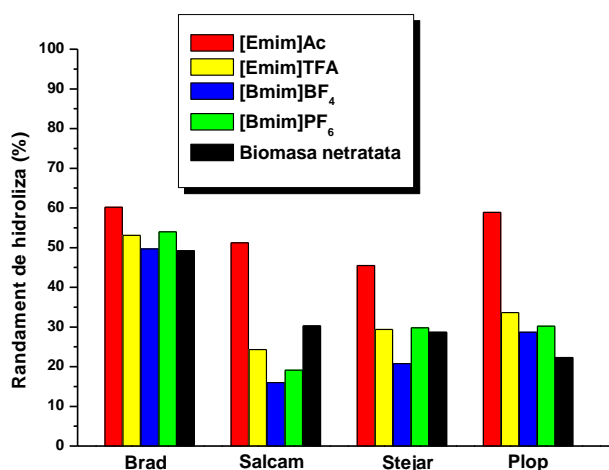


Figura II.5. Efectul pretratamentului cu lichide ionice asupra hidrolizei enzimatică a celulozei, după 4 ore de reacție

Din Figura II.5 rezultă că cel mai eficient lichid ionic folosit pentru pretratarea biomasei lignocelulozice a fost [Emim]Ac. Publicații recente au demonstrat că lichidul ionic [Emim]Ac a fost mai eficient în pretratarea și dizolvarea biomasei, comparativ cu alte lichide ionice, cum ar fi: clorură de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Bmim]Cl), acetat de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]Ac), dietilfosfat 1-etil-3-metilimidazoliu [Emim]DEP, respectiv metilsulfat de 1,3-dimetilimidazoliu ([Mmim]MeSO₄) [125, 130, 131]. De exemplu, la 110°C, timp de 16 ore, [Emim]Ac a dizolvat 93,5% din pin, iar [Bmim]Cl a dizolvat 26,0% din pin [125]. Pretratarea rădăcinoaselor de Cassava cu [Emim]Ac la 120°C, a dus la obținerea unui randament de hidroliză de 90,03%, iar când pretratarea s-a făcut cu [Emim]DEP conversia biomasei pretratate a fost de 75,03% [131].

În urma hidrolizei enzimatică a biomasei pretratate cu [Emim]Ac, randamentul de hidroliză, calculat după 4 ore de reacție, a crescut cu aproximativ 10% pentru brad, 20% pentru salcâm și stejar, respectiv 40% pentru plop,

comparativ cu biomasa netratată. Dintre cele patru tipuri de biomasă pretratată cu [Emim]Ac, plopul pretratată a fost hidrolizat cu eficiența cea mai mare, probabil deoarece acesta are cel mai mic conținut de lignină, iar enzima are tendința de a se adsorbi pe lignină și în acest fel își pierde parțial activitatea [160].

Deoarece lichidele ionice sunt capabile să dizolve lignina din biomasa lignocelulozică s-a determinat conținutul total de lignină dizolvată în soluția de lichid ionic [159]. Metoda de analiză a ligninei dizolvate este prezentată în paragraful III.3.3. Conținutul total de lignină dizolvată în lichidul ionic [Emim]Ac și [Emim]TFA pentru fiecare tip de biomasă studiată este prezentat în Tabelul II.12 și Tabelul II.13.

Tabelul II.12. Cantitatea totală de lignină dizolvată în lichidul ionic [Emim]Ac

Biomasă	Cantitate totală de lignină dizolvată	
	(mg)	(%) ^a
Brad	6,58	21,73
Salcâm	14,32	47,93
Stejar	8,05	36,65
Plop	6,63	35,89

^a Raportată la cantitatea totală de lignină din rumeguș

Tabelul II.13. Cantitatea totală de lignină dizolvată în lichidul ionic [Emim]TFA

Biomasă	Cantitate totală de lignină dizolvată	
	(mg)	(%) ^a
Brad	5,76	19,03
Salcâm	9,18	30,74
Stejar	5,10	23,21
Plop	5,52	29,87

^a raportată la cantitatea totală de lignină din rumeguș

Lichidul ionic [Emim]Ac a fost capabil să dizolve, după 24 ore, aproximativ 48% lignină din rumegușul de salcâm, și 21% lignină din brad. Lichidul ionic ce conține anionul trifluoroacetat a dizolvat aproximativ 30% lignină din salcâm, respectiv 19% lignină din brad. Aproximativ 35% lignină din esențele tari de lemn (plop și stejar) s-au dizolvat în lichidul ionic [Emim]Ac după 24 de ore, comparativ cu [Emim]TFA care a dizolvat aproximativ 23% lignină din rumegușul de stejar, respectiv 29% din rumegușul de plop. Lichidul ionic ce conține anionul acetat a fost mai eficient în dizolvarea ligninei din biomasă decât lichidul ionic ce conține anionul trifluoroacetat.

Deoarece dintre cele 4 lichide ionice studiate [Emim]Ac a fost cel mai eficient pentru pretratarea biomasei lignocelulozice, acesta a fost folosit în studiile următoare.

II.2.2.4. Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretratată cu acid sulfuric diluat/lichid ionic

Pentru îmbunătățirea eficienței de hidroliză a polizaharidelor din biomasa lignocelulozică, cele patru tipuri de rumeguș studiate s-au pretratată atât cu acid sulfuric diluat cât și cu lichidul ionic [Emim]Ac [157].

S-a recurs la această metodă de pretratare deoarece are loc creșterea cantității de zaharuri fermentescibile din hemiceluloză (în special xiloza) datorită

II.2. Pretratarea biomasei lignocelulozice prin metode neconvenționale 83

capacității acidului sulfuric diluat de a hidroliza parțial hemiceluloza din rumeguș (vezi paragraful II.2.2.1), și a cantității de zaharuri eliberate în urma hidrolizei celulozei din biomasă datorită capacității lichidului ionic ce conține anionul acetat de a îmbunătăți accesul celulozei la substrat prin scăderea gradului de cristalinitate a celulozei din biomasă și îndepărtarea ligninei. Metoda de pretratament a fost descrisă la paragraful III.2.2.4. După pretratarea a 300 mg rumeguș cu acid sulfuric diluat, 100 mg biomasă pretratată cu acid, care conține celuloză, lignină și hemiceluloză nehidrolizată s-a pretratată, din nou, cu [Emim]Ac. Biomasă rezultată după al doilea pretratament a fost supusă hidrolizei enzimatice, utilizând celuloza nativă. Valorile cantităților totale de zaharuri eliberate în urma hidrolizei enzimatice a celulozei din biomasă pretratată, exprimate ca glucoză echivalentă, sunt prezentate în Tabelul II.14.

Tabelul II.14. Efectul pretratamentului cu acid sulfuric diluat/lichid ionic asupra hidrolizei enzimatice a celulozei din biomasă lignocelulozică

Timp (ore)	Concentrație totală de Zaharuri (mg/ml)				Randament de hidroliză ^a (%)			
	Brad	Salcâm	Stejar	Plop	Brad	Salcâm	Stejar	Plop
1	2,16	1,22	2,19	2,81	34,95	20,39	30,85	37,38
2	2,68	3,28	3,88	3,85	43,37	54,83	54,67	51,21
3	3,99	3,99	4,47	4,02	59,86	58,07	62,98	53,61
4	4,04	4,01	5,23	4,87	65,38	67,03	73,69	64,78
5	4,14	4,28	5,09	5,01	67,00	71,74	71,72	66,64
6	4,15	4,38	5,29	5,29	67,16	73,18	74,53	70,37

^a Raportat la cantitatea totală de zaharuri din rumeguș (%)

În cazul lemnului de esență moale de brad și salcâm, cantitatea de zaharuri eliberată după 5 ore de reacție, în urma hidrolizei enzimatice a celulozei, a fost de 4,14 mg/ml, respectiv 4,28 mg/ml, după care a rămas aproximativ constantă. Aceasta înseamnă că după 5 ore de hidroliză conversia celulozei din biomasă pretratată cu acid sulfuric diluat/lichid ionic a fost practic totală. Cantitatea de zaharuri eliberate în urma hidrolizei celulozei din stejarul pretratată a crescut până la 4 ore de reacție, la 5,23 mg/ml, după care s-a menținut aproximativ constantă, din același motiv. Pentru biomasă de plop, lemn de esență tare, cantitatea de zaharuri a crescut pe tot intervalul de timp studiat, fiind de 5,29 mg/ml după 6 ore de reacție.

Pentru a ilustra mai sugestiv influența metodelor de pretratament a biomasei asupra eficienței de hidroliză a celulozei din biomasă pretratată, s-a realizat Figura II.6, pe baza datelor din Tabelul II.2, Tabelul II.3, Tabelul II.8, Tabelul II.9, Tabelul II.10, Tabelul II.11 și Tabelul II.14, la timp de reacție de 4 ore.

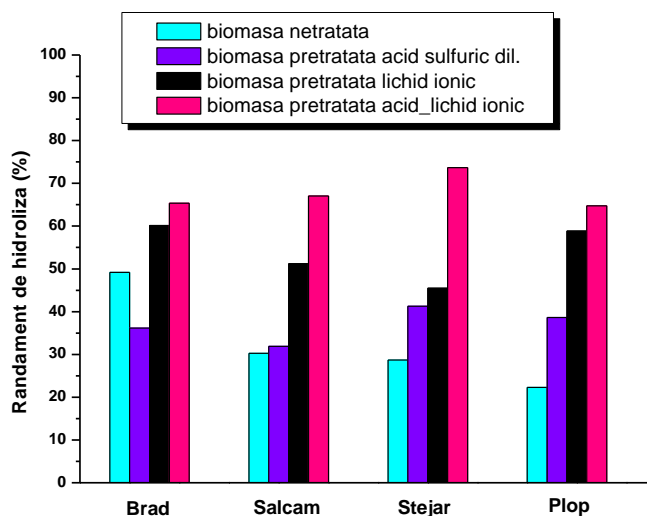


Figura II.6. Influența pretratamentului cu acid sulfuric diluat și/sau lichid ionic asupra eficienței de hidroliză a celulozei din biomasa lignocelulozică, după 4 ore de reacție. Condiții de hidroliză: 10 mg/ml biomasă pretrată și netratată, tampon acetat de sodiu pH 4,8, 5 μ l/ml celulază, 40°C

Pretratarea biomasei lignocelulozice prin metoda combinată cu acid sulfuric diluat/lichid ionic a fost mai eficientă pentru hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă decât pretratarea simplă cu acid sulfuric, respectiv lichid ionic (Figura II.6). Pretratarea biomasei cu [Emim]Ac a determinat obținerea unor randamente mai mari de hidroliză decât în cazul folosirii în reacția de hidroliză a biomasei pretratate cu acid sulfuric diluat. Li ș.a. au comparat pretratarea ierburilor cu acid diluat și pretratarea cu [Emim]Ac. Randamentul de hidroliză al ierburilor pretratate cu [Emim]Ac a crescut cu 16% față de biomasă pretrată cu acid diluat, respectiv cu 54% față de biomasă netratată. Mai mult, ei au observat că în urma pretrării biomasei cu acid sulfuric diluat a crescut indicele de cristalinitate al celulozei de la 26,2 (pentru biomasă netratată) la 39,1, iar când biomasă s-a pretrat cu [Emim]Ac indicele de cristalinitate al celulozei a scăzut la 2,6 [127].

În urma hidrolizei enzimatică a celulozei din biomasă pretrată cu acid sulfuric diluat/lichid ionic, randamentul de hidroliză a crescut cu aproximativ 5% pentru brad, 15% pentru salcâm, respectiv 7% pentru plop și 28% pentru stejar, comparativ cu randamentele de hidroliză obținute în urma hidrolizei celulozei din biomasă pretrată cu lichid ionic (s-a comparat cu pretratamentul cu lichid ionic deoarece acesta a fost mai eficient decât pretratamentul cu acid sulfuric).

II.2.2.5. Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă pretrată cu glicerină pură/lichid ionic

Biomasa lignocelulozică s-a pretrat, într-o primă etapă, cu glicerină, urmată de un al doilea pretratament, cu lichidul ionic [Emim]Ac [157]. Prin pretratarea biomasei cu glicerină are loc dizolvarea unei cantități de lignină din

biomasă (cantitățile de lignină din biomasă dizolvate în glicerină au fost prezentate în Tabelul II.7). Prin pretratarea biomasei lignocelulozice cu lichidul ionic [Emim]Ac are loc, pe lângă dizolvarea ligninei din biomasă, și scăderea indicelui de cristalinitate al celulozei (cantitățile de lignină din biomasă dizolvate în [Emim]Ac au fost prezentate în Tabelul II.12).

Astfel metoda combinată de pretratament permite îndepărtarea unei cantități mai mari de lignină din biomasă, prin urmare se facilitează accesul enzimei la celuloză.

Metoda combinată de pretratament cu glicerină/lichid ionic a fost descrisă la paragraful III.2.2.5. Biomasa pretrată prin metoda combinată cu glicerină/lichid ionic a fost supusă hidrolizei enzimatică cu celuloza nativă Celluclast 1.5L. Cantitățile totale de zaharuri, exprimate ca glucoză echivalentă, eliberate în timpul reacției de hidroliză enzimatică a celulozei din cele patru tipuri de biomasă pretrată sunt prezentate în Tabelul II.15.

Tabelul II.15. Efectul pretratamentului cu glicerină/lichid ionic asupra hidrolizei enzimatică a celulozei

Timp (ore)	Concentrație totală de zaharuri (mg/ml)				Randament de hidroliză ^a (%)			
	Brad	Salcâm	Stejar	Plop	Brad	Salcâm	Stejar	Plop
1	1,82	2,06	1,81	1,04	27,30	29,98	24,27	12,86
2	3,15	3,89	2,99	2,03	47,26	56,61	40,10	25,86
3	4,32	4,16	4,98	4,24	64,81	60,54	66,80	54,02
4	4,41	4,36	5,12	5,21	66,16	61,62	68,67	66,38
5	4,39	4,39	5,20	5,27	65,86	63,88	69,75	67,15
6	4,41	4,30	5,18	5,31	66,16	62,57	69,48	67,66

^a Raportat la cantitatea totală de zaharuri din rumeguș (%)

În cazul lemnului de esență moale (brad și salcâm), cantitatea de zaharuri a crescut în primele 3 ore de reacție, la 4,41 mg/ml, respectiv 4,36 mg/ml, după care s-a menținut aproximativ constantă, ceea ce arată că s-a atins un grad de hidroliză apropiat de 100%.

După 4 ore de reacție, cantitatea de zaharuri eliberate în urma hidrolizei celulozei din biomasa de stejar și biomasa de plop pretratate a fost de 5,12 mg/ml, respectiv 5,21 mg/ml (din 10 mg/ml substrat introdus la hidroliză). După 4 ore, hidroliza celulozei din lemnul de esență tare pretratată s-a menținut constantă, aceasta deoarece conversia celulozei la zaharuri a fost totală. Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele din literatură conform cărora cantitatea de celuloză din lemnul de esență tare este de 38-51% [18].

Pentru a ilustra mai sugestiv influența metodelor de pretratament asupra randamentului hidrolizei enzimatică a biomasei pretratate s-a realizat Figura II.7, pe baza datelor din Tabelul II.2, Tabelul II.5, Tabelul II.8, Tabelul II.9, Tabelul II.10, Tabelul II.11 și Tabelul II.15 la timp de reacție de 4 ore.

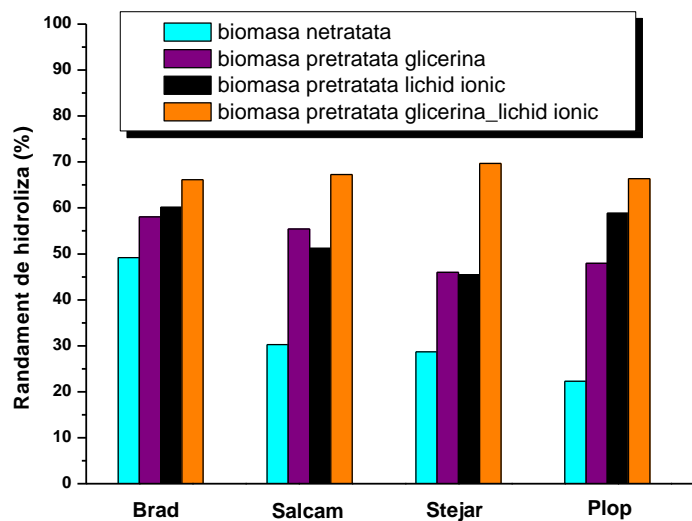


Figura II.7. Influența pretratamentului cu glicerină și/sau lichid ionic asupra eficienței de hidroliză a celulozei din biomasa lignocelulozică, după 4 ore de reacție. Condiții de hidroliză: 10 mg/ml biomasă pretrată și netratată, tampon acetat de sodiu pH 4,8, 5 μ L/ml celuloză, 40°C.

Pretratarea biomasei lignocelulozice prin metoda combinată cu glicerină/lichid ionic a fost mai eficientă pentru hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă, decât pretratarea simplă cu glicerină, respectiv lichid ionic (Figura II.7). Toate cele trei metode de pretratare determină creșterea randamentului de hidroliză a celulozei din biomasă. Lichidul ionic [Emim]Ac a fost mai eficient în pretratarea biomasei de plop și brad decât glicerina pură. În urma hidrolizei enzimatică a celulozei din biomasa pretrată cu [Emim]Ac, randamentul de hidroliză, calculat după 4 ore de reacție, a crescut cu aproximativ 3% pentru brad, respectiv 10% pentru plop, comparativ cu randamentele de hidroliză obținute în urma hidrolizei celulozei din biomasa pretrată cu glicerină. Nu s-au observat diferențe semnificative ale randamentelor de hidroliză ale celulozei din biomasa de stejar pretrată cu lichid ionic, respectiv cu glicerină. În cazul rumegușului de salcâm, pretratarea cu glicerină pură a fost mai eficientă pentru hidroliza celulozei decât pretratarea cu lichid ionic. Hidroliza enzimatică a celulozei din biomasa pretrată prin metoda combinată cu glicerină/lichid ionic a avut după 4 ore un randament cu aproximativ 6% mai mare pentru brad, 10% pentru salcâm, respectiv 8% pentru plop și 25% pentru stejar, comparativ cu randamentele de hidroliză a celulozei din biomasa pretrată cu lichid ionic. Creșterea randamentelor de hidroliză se datorează, probabil, îndepărtării unei cantități mai mari de lignină din biomasă în urma pretratamentului prin metoda combinată cu glicerină/lichid ionic.

Dintre metodele combinate de pretratare studiate, pretratamentul cu glicerină/lichid ionic a fost mai eficient decât cel cu acid/lichid ionic, în ceea ce privește gradul final de hidroliză. De exemplu, după 3 ore randamentul de hidroliză al celulozei din brad și salcâm pretrată cu acid/lichid ionic a fost de 59,86%, respectiv de 58,07% (Tabelul II.14), iar al celui din rumegușul de brad și salcâm pretrată cu glicerină/lichid ionic a ajuns la 64,81%, respectiv 60,54% (Tabelul

II.15). În cazul lemnului de esență tare de stejar și plop pretratată cu acid/lichid ionic, randamentul de hidroliză a fost de 62,98%, respectiv 53,61%, după 3 ore de reacție (Tabelul II.14). Când biomasa de stejar și plop a fost pretratată cu glicerină/lichid ionic, acest randament a crescut la 66,80%, respectiv 54,02% (Tabelul II.15). Creșterea randamentelor de hidroliză în urma pretratării biomasei cu glicerină/lichid ionic, comparativ cu randamentele biomasei pretratate cu acid diluat/lichid ionic, se datorează îndepărtării unei cantități mai mari de lignină din biomasă, atât cu glicerină cât și cu lichid ionic, ceea ce face ca accesul celulei la substrat să fie îmbunătățit.

II.2.3. Stabilirea condițiilor optime pentru pretratamentul biomasei lignocelulozice cu lichid ionic

Dintre metodele de pretratament investigate, pentru un studiu mai detaliat a fost selectată cea cu lichid ionic, ținând cont de faptul că este o metodă nouă, cu eficiență ridicată și potențial de dezvoltare viitoare.

S-a demonstrat anterior că lichidele ionice care conțin anionul acetat sunt capabile să dizolve eficient celuloza și lignina din biomasa lignocelulozică. Drept urmare, lichidul ionic utilizat în aceste studii a fost [Emim]Ac. Capacitatea de dizolvare a celulozei este normal să crească odată cu creșterea temperaturii și a timpului de operare, însă în același timp crește și posibilitatea de degradare a celulozei, iar structura lichidului ionic poate fi afectată. Pentru stabilirea condițiilor optime de pretratament, s-au studiat efectele temperaturii și timpului de pretratere, cât și posibilitatea utilizării lichidului ionic în amestec cu un solvent organic.

II.2.3.1. Influența temperaturii de pretratere asupra hidrolizei enzimice a celulozei din biomasa pretratată cu [Emim]Ac

Pentru a determina temperatura de pretratere la care eficiența de hidroliză este cea mai bună, 100 mg rumeguș de plop a fost pretratată timp de 24 ore cu [EMIM]Ac la diferite temperaturi (40°C, 60°C, 80°C, 90°C, 100°C). 10 mg/ml plop pretratată a fost hidrolizată enzimatic în 10 ml tampon acetat de sodiu 0,05 M (pH 4,8), utilizând celuloza nativă Celluclast 1.5L. Tabelul II.16. prezintă evoluția în timp a reacției de hidroliză a celulozei din biomasa de plop pretratată, la diferite temperaturi.

Tabelul II.16. Evoluția în timp a hidrolizei enzimice a rumegușului de plop pretratată cu [Emim]Ac, la diferite temperaturi

Temperatura de pretratere (°C)	Randament de hidroliză ^a (%)			
	2 ore	4 ore	6 ore	8 ore
40	24,97	35,04	40,65	48,29
60	28,03	42,17	49,82	56,72
80	33,63	49,82	63,20	65,63
90	42,68	54,02	66,25	68,50
100	49,18	62,43	67,40	68,80

^a Raportat la cantitatea totală de zaharuri din plop (%)

Influența temperaturii de pretratament asupra cantității totale de zaharuri reducătoare, eliberate în cursul hidrolizei enzimice a biomasei de plop pretratată cu [Emim]Ac, este prezentată în Figura II.8.

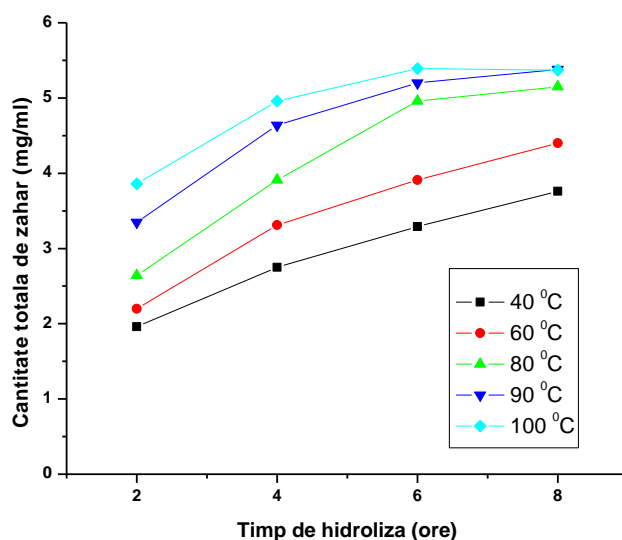


Figura II.8. Influența temperaturii de pretratare asupra hidrolizei enzimatică a celulozei din rumeguș de plop

Se observă (Figura II.8) că prin creșterea temperaturii de pretratare crește cantitatea de zahăr eliberată în timp la hidroliza celulozei. Nu s-au observat diferențe mari ale randamentelor de hidroliză pentru rumegușul de plop pretratat la 90°C și plopul pretratat la 100°C la diferite intervale de timp, iar randamentele de hidroliză obținute după 8 ore de reacție au fost foarte apropiate (67% și 68% pentru rumegușul de plop pretratat la temperatura de 90°C, respectiv 100°C).

S-a determinat și cantitatea de lignină dizolvată în soluția de [Emim]Ac la fiecare din temperaturile studiate. Tabelul II.17 prezintă cantitatea totală de lignină dizolvată în lichidul ionic în funcție de temperatură, după 24 ore de pretratare.

Tabelul II.17. Cantitatea totală de lignină dizolvată [Emim]Ac, la diferite temperaturi de pretratare a rumegușului de plop

Timp (ore)	Cantitate totală de lignină dizolvată	
	(mg)	(%) ^a
40	1,37	7.44
60	3,87	20.98
80	6,81	36.85
90	6,92	37.37
100	7,45	40.34

^a Raportată la cantitatea totală de lignină din rumegușul de plop

Odată cu creșterea temperaturii de pretratare a crescut și cantitatea de lignină dizolvată în soluția de lichid ionic (Tabelul II.17). Deoarece lignina împiedică accesul enzimei la celuloză, prin dizolvarea unei cantități cât mai mari de lignină în lichidul ionic, scade cantitatea de lignină din plopul pretratat, ceea ce ușurează contactul dintre enzime și celuloza din biomasă. Drept urmare, odată cu creșterea temperaturii de pretratare, prin îndepărtarea unei cantități cât mai mari de lignină

din biomasa de plop, crește cantitatea de zaharuri eliberată în urma reacției de hidroliză enzimatică a celulozei (Figura II.8).

Deoarece randamentele de hidroliză la 90°C și 100°C au fost identice și nici diferențele în ceea ce privește cantitatea de lignină dizolvată nu au fost mari, s-a ales ca temperatură de pretratere 90°C. Lucrându-se la o temperatură mai scăzută se face economie de energie și se reduce posibilitatea de degradare a celulozei și de modificare a structurii lichidului ionic.

II.2.3.2. Stabilirea timpului optim de pretratament

Pentru stabilirea timpului optim de pretratere (la temperatura de 90°C) astfel încât lichidul ionic să dizolve o cantitate cât mai mare de celuloză, însă fără ca aceasta să fie degradată, s-a efectuat un studiu cu celuloză standard Avicel PH101. 50 mg Avicel PH101 s-a introdus în 1 ml lichid ionic la temperatura de 90°C, s-a menținut sub agitare un anumit timp, după care celuloza dizolvată a fost recuperată prin precipitare cu apă distilată. Tabelul II.18 prezintă influența timpului de pretratere asupra cantității de celuloză recuperată din soluția de [Emim]Ac.

Tabelul II.18. Efectul timpului de pretratere asupra randamentului de recuperare a celulozei după dizolvare în lichidul ionic [Emim]Ac, 90°C

Timp de pretratere (ore)	Celuloză regenerată	
	(mg)	(%)
0,5	48,34	96,68
2	49,02	98,04
4	47,90	95,80
6	48,56	97,12
8	41,67	83,34
10	39,85	79,70

După doar 30 minute soluția de lichid ionic a devenit limpede, celuloza fiind complet dizolvată, însă după 6 ore de pretratere culoarea soluției a devenit mai închisă. Creșterea timpului de pretratere peste 6 ore a determinat scăderea cantității de celuloză recuperată. Aproximativ 97% celuloză a fost recuperată din soluția de lichid ionic după 6 ore de pretratere, în timp ce după 8 ore de pretratere cantitatea de celuloză recuperată a scăzut la aproximativ 83%. La acest timp de operare (8 ore), soluția de lichid ionic/apă, rămasă după precipitarea celulozei, a avut o colorație mai intensă comparativ cu cea obținută după 6 ore.

II.2.3.3. Stabilirea compoziției optime de amestec DMSO/[Emim]Ac

Pe lângă o serie de avantaje, lichidele ionice au și dezavantajele prețului ridicat și al vâscozității mari, ceea ce face dificilă recuperarea și reutilizarea lor în mai multe cicluri de pretratament. Din acest motiv, s-a studiat posibilitatea utilizării lichidului ionic [Emim]Ac în amestec cu un solvent organic, capabil de asemenea să dizolve celuloza din biomasa lignocelulozică. Găsirea unui asemenea solvent nu este simplă, deoarece acesta trebuie să fie miscibil cu lichidul ionic și să aibă volatilitate suficient de mică pentru a permite pe de o parte efectuarea pretratamentului la o temperatură suficient de ridicată pentru solubilizarea eficientă a celulozei și ligninei, iar pe de altă parte eliminarea ulterioară a apei. Un asemenea solvent este dimetilsulfoxidul (DMSO), miscibil cu apa și cunoscut pentru capacitatea sa ridicată

de a solubiliza compuși cu polaritate ridicată, așa cum sunt celuloza și lignina. În consecință, s-a stabilit ca pentru dizolvarea biomasei lignocelulozice să se folosească un amestec de dimetilsulfoxid(DMSO) și lichid ionic ([Emim]Ac). Dintre tipurile de biomasă, a fost selectat și pentru acest studiu cel din plop, deoarece hidroliza enzimatică a celulozei din plopul pretratată cu [Emim]Ac a avut loc cu eficiența cea mai ridicată (așa cum a rezultat în capitolul II.2.2.3). Principalul avantaj al utilizării amestecului de dimetilsulfoxid/lichid ionic pentru dizolvarea celulozei și ligninei din biomasă este scăderea vâscozității lichidului ionic, acest lucru permițând o agitare mai bună, scăderea costurilor procesului, separarea mai ușoară a materialului lignocelulozic nedizolvat și reutilizarea repetată a amestecului.

Pentru stabilirea compoziției optime a amestecului de dizolvare DMSO/[Emim]Ac s-a utilizat un amestec sintetic, denumit biomasă standard, format din 50 mg celuloză Avicel PH101 și 30 mg lignină standard Kraft, care a fost supus pretramentului cu amestec DMSO/[Emim]Ac în diferite proporții, timp de 6 ore, la 90°C.

În Tabelul II.19 se prezintă cantitățile de celuloză Avicel PH101 recuperată, de lignină Kraft dizolvată, respectiv lignină precipitată din diferitele amestecuri de DMSO/[Emim].

Tabelul II.19. Dizolvarea celulozei și ligninei din amestecul de biomasă standard în soluția de DMSO/[Emim]Ac și recuperarea celulozei

Compoziția amestecului DMSO:[Emim]Ac	Raport biomasă /solvent (mg/ml)	Reziduu (%)	Celuloză regenerată ^a (%)	Lignină dizolvată ^b (%)	Lignină regenerată ^c (%)
100% DMSO	80	60,1	10,42	24,23	-
70% DMSO: 30% [Emim]Ac	80	29,31	44,82	64,03	4,56
50% DMSO: 50% [Emim]Ac	80	8,6	78,42	84,60	23,34
	54	TD	95,84	96,97	25,98
	40	TD	98,48	99,98	29,59
30% DMSO: 70% [Emim]Ac	80	TD	97,56	96,37	31,45
100%[Emim]Ac	80	TD	96,60	96,93	35,21

TD – dizolvat în totalitate

^a Raportată la cantitatea inițială de 50 mg celuloză din amestec

^b Raportată la cantitatea inițială de 30 mg lignină din amestec

^c Raportată la cantitatea totală de lignină dizolvată în soluția de DMSO/[Emim]Ac

Se observă că prin creșterea cantității de lichid ionic în amestecul de DMSO/[Emim]Ac crește cantitatea de celuloză și lignină dizolvată. 1 mL DMSO/[Emim]Ac în raport 30:70 (% , vol) a fost capabil să dizolve complet, după 6 ore de reacție, 80 mg amestec care conține 50 mg celuloză, respectiv 30 mg lignină, în timp ce 1 ml DMSO/[Emim]Ac în raport 50:50 (% , vol) a dizolvat 91,4% din acest amestec standard. Cantitatea de lignină dizolvată în solventul DMSO/[Emim]Ac în raport 50:50 a crescut odată cu scăderea raportului biomasă standard/solvent, așa cum se observă în Tabelul II.19. Scăderea raportului biomasă standard/solvent de la 80 mg/ml la 54 mg/ml a determinat dizolvarea completă a celulozei Avicel și ligninei standard Kraft. Pentru îmbunătățirea agitării amestecului standard, a separării materialului nedizolvat datorită scăderii vâscozității soluției de dimetilsulfoxid/lichid ionic și creșterii eficienței economice s-a ales ca pentru dizolvarea biomasei

lignocelulozice să se opereze cu amestecul DMSO/[Emim]Ac în raport 50:50 (% , vol).

Dizolvarea celulozei timp de 10 minute, la 110°C, într-un amestec de DMSO/[Amim]Cl de diferite concentrații a fost studiată de Tian ș.a. Ei au observat de asemenea că prin creșterea concentrației de lichid ionic în amestec a crescut cantitatea de celuloză dizolvată și a scăzut gradul de cristalinitate al celulozei regenerată de la 0,8 (pentru celuloza netratată) la 0,25 pentru celuloza pretrată cu DMSO/[Amim]Cl. Randamentul de hidroliză obținut atunci când celuloza a fost dizolvată în DMSO/[Amim]Cl în raport 30:70 a fost de 54,1%, aproximativ egal cu cel obținut atunci când s-a folosit [Amim]Cl pur (59,6%) [161].

În urma acestor rezultate, s-a stabilit utilizarea pentru experimentele următoare a amestecului DMSO/[Emim]Ac în raport 50:50 (% , vol).

II.2.4. Determinarea parametrilor procesului de pretratament cu amestec DMSO/[Emim]Ac pentru recuperarea celulozei și ligninei din biomasă și reutilizarea lichidului ionic

S-a studiat dizolvarea celulozei și ligninei din biomasa de plop pretratat cu acid sulfuric diluat (pretratarea plopului cu acid sulfuric diluat a fost descrisă la paragraful III.2.2.1) cu soluția de dimetilsulfoxid/lichid ionic. Rumeșul de plop s-a pretratat la început cu acid sulfuric diluat pentru creșterea cantității de zaharuri fermentescibile, atât din hemiceluloză (datorită capacității acidului de a hidroliza hemiceluloza din biomasă la zaharuri fermentescibile, în special xiloză) cât a celor rezultate în urma hidrolizei enzimatică a celulozei recuperate din solvent (DMSO/[Emim]Ac). Pentru aceasta, 1 g rumeș de plop măcinat și uscat s-a pretratat cu 10 ml acid sulfuric 0,82%. Aproximativ 17,21% din zaharurile din această biomasă s-au hidrolizat după pretratamentul aplicat.

100 mg plop pretratat cu acid sulfuric diluat (conținând aproximativ 22,25 % lignină și 54,38 % celuloză) s-au tratat cu 4 ml DMSO/[Emim]Ac (în raport volumic 50:50) timp de 6 ore la temperatura de 90°C. Cantitatea de celuloză din biomasa de plop s-a estimat la 47%, în condițiile în care prin hidroliza enzimatică a 10 mg/ml celuloză standard Avicel rezultă 11,9 mg/ml zaharuri totale (exprimate ca glucoză echivalentă), iar prin hidroliza enzimatică a celulozei din 10 mg/ml plop am obținut în studiile anterioare aproximativ 5,3 mg/ml zaharuri totale. Această valoare este în concordanță cu datele de literatură, conform cărora lemnul de esență tare conține între 38-51% celuloză [18]. Cantitatea totală de lignină din rumeșul de plop, (calculată conform metodei descrise de la paragraful III.3.3), a fost de 18,49%. În paralel s-a realizat și o probă martor, care a conținut 100 mg amestec de biomasă standard (80% celuloză Avicel PH101 și 20% lignină standard Kraft) dizolvată în aceeași cantitate de DMSO/[Emim]Ac.

După pretratare timp de 6 ore, materialul nedizolvat s-a separat prin filtrare la cald. După precipitarea în primă fază a celulozei, lignina rămasă dizolvată în soluția de DMSO/[Emim]Ac s-a precipitat cu apă în exces, prin menținerea soluției la frigider timp de 48 ore. Lignina precipitată s-a filtrat și s-a uscat la 50°C. După recuperarea celulozei și ligninei dizolvate, soluția de DMSO/[Emim]Ac s-a recuperat prin evaporarea apei și s-a folosit în următorul ciclu de dizolvare. Tabelul II.20 și Tabelul II.21 prezintă cantitatea de material nedizolvat și celuloză recuperată din soluția de DMSO/[Emim]Ac, după fiecare ciclu de utilizare al soluției de pretratament [162].

Tabelul II.20. Cantitatea de material rămas nedizolvat după pretratarea a 100 mg biomasă standard sau rumeguș de plop pretratată cu DMSO/[Emim]Ac 50:50

Număr cicluri	Reziduu după pretratament			
	Biomasă Standard		Plop pretratată	
	mg	%	mg	%
0	TD	0	60,12	60,12
1	TD	0	65,23	65,23
2	10,22	10,22	72,56	72,56
3	21,27	21,27	80,29	80,29
4	30,33	30,33	80,24	80,24

TD - materialul lignocelulozic s-a dizolvat în totalitate

Tabelul II.21. Cantitatea de celuloză recuperată după cicluri repetate de pretratament cu DMSO/[Emim]Ac 50:50

Număr ciclu	Celuloză recuperată			
	Biomasă Standard		Plop pretratată	
	mg	% ^a	mg	% ^a
0	79,03	98,97	30,89	56,35
1	76,02	95,02	28,74	52,43
2	68,32	85,4	20,21	36,86
3	56,54	70,67	16,29	29,71
4	50,24	63,80	16,09	29,36

^a Raportată la cantitatea inițială de celuloză (80 mg din biomasa standard, respectiv 54,38 mg din plop pretratată)

Tabelul II.22 prezintă cantitățile de lignină dizolvate și recuperate din soluția de DMSO/[Emim]Ac. Cantitatea de lignină dizolvată în amestecul de DMSO/[Emim]Ac s-a calculat conform metodei descrise la paragraful III.3.3. Conținutul total de lignină în fiecare ciclu de reutilizare s-a calculat prin diferența dintre conținutul total de lignină în soluție și lignina rămasă la ciclul anterior.

Tabelul II.22. Determinarea cantității de lignină dizolvată și lignină reprecipitată din soluția de DMSO/[Emim]Ac

Număr cicluri	Conținut de lignină dizolvată (%) ^a				Lignină reprecipitată (%) ^b			
	Biomasă Standard		Plop pretratată		Biomasă Standard		Plop pretratată	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
0	18,92	94,50	5,1	22,92	6,13	32,43	1,32	25,89
1	19,18	95,90	3,55	15,98	11,47	35,98	1,72	23,45
2	17,47	87,34	1,24	5,57	11,72	30,89	2,04	29,87
3	17,20	85,98	0,72	3,21	13,59	31,25	0,85	15,47
4	16,48	82,32	0,67	3,03	13,58	29,34	1,09	20,47

^a raportată la cantitatea totală de lignină din amestecul standard, respectiv plop pretratată

^b raportată la cantitatea totală de lignină dizolvată

Soluția DMSO/[Emim]Ac dizolvă complet celuloza Avicel și lignina standard după 6 ore de pretratament, în timp ce doar 56,53% celuloză, respectiv 22,92 % lignină au fost dizolvate din rumegușul de plop pretratată (Tabelul II.21 și Tabelul II.22). Fort ș.a. au investigat dizolvarea popului într-o soluție de [Bmim]Cl/DMSO la

diferite intervale de timp și temperatura de 100°C, constatând că 28% din materialul celulozic s-a dizolvat după 6 ore de reacție [106].

După precipitarea celulozei și ligninei dizolvate, soluția de DMSO/lichid ionic s-a recuperat și s-a utilizat într-un nou ciclu de dizolvare. În prima etapă de reutilizare, capacitatea de dizolvare a celulozei și ligninei din plop a scăzut cu câteva procente. Începând cu cel de-al doilea ciclu de reutilizare, cantitatea de celuloză dizolvată a scăzut mai pronunțat pentru ambele probe, la aproximativ 85% celuloză dizolvată din biomasa standard, respectiv 37% celuloză dizolvată din plopul pretratată. Cantitatea de lignină dizolvată din rumegușul de plop pretratată a scăzut la numai 5% când soluția de DMSO/[Emim]Ac s-a reutilizat a doua oară. În final, după 4 cicluri de utilizare, soluția de dimetilsulfoxid/lichid ionic a dizolvat 63,80% celuloză din biomasa standard, respectiv 29,36% celuloză din rumegușul de plop. În toate cazurile s-a reprecipitat o cantitate mai mare de lignină din proba de amestec standard pretratată decât din proba de plop. De exemplu, pentru proba de amestec standard, cantitatea de lignină precipitată din solvent a fost de aproximativ 29%, după ciclul patru de utilizare, comparativ cu 20% lignină precipitată la același ciclu pentru proba de plop.

Soluția DMSO/[Emim]Ac folosită pentru dizolvarea biomasei lignocelulozice a căpătat o culoare tot mai închisă (spre maro închis) și a devenit mai vâscoasă după fiecare reutilizare, aceasta datorându-se acumulării ligninei în amestecul de pretratament, reducându-se astfel și capacitatea acesteia de dizolvare.

II.2.4.1. Caracterizarea celulozei și ligninei recuperate din soluția de DMSO/[Emim]Ac prin spectrofotometrie FT-IR

Celuloza și lignina recuperate din soluția de DMSO/[Emim]Ac au fost analizate prin spectrofotometrie FT-IR. Spectrele IR ale celulozei și ligninei sunt prezentate în Figura II.9 și Figura II.10 [162].

Spectrul FT-IR al celulozei regenerate din soluția de DMSO/[Emim]Ac, în urma dizolvării plopului pretratată și a amestecului standard este asemănător cu cel al celulozei microcristaline Avicel PH101. Mica diferență dintre spectre se datorează scăderii gradului de cristalinitate al celulozei regenerate din soluția de DMSO/[Emim]Ac. Zhang ș.a. au relatat că lichidele ionice distrug legăturile inter și intramoleculare din celuloză scăzând astfel gradul de cristalinitate [114]. În consecință, s-a observat o lărgire a benzilor, în cazul spectrelor celulozei regenerate, de la 1429 cm⁻¹ caracteristice grupării C-OH, 1373 cm⁻¹ caracteristice grupărilor OH și 1321 cm⁻¹ atribuite vibrațiilor -CH₂ (Figura II.9.b, c). S-au observat diferențe ale spectrelor celulozei recuperate din soluția de DMSO/[Emim]Ac, comparativ cu celuloza standard nedizolvată pentru benzile de la 1164 cm⁻¹ (atribuite grupării C-O-C), 1114 cm⁻¹ și de la 1058 cm⁻¹ (atribuite grupării C-O). Benzi similare au apărut la 895 cm⁻¹ care pot fi atribuite inelului piranozic.

Casas ș.a. au obținut rezultate asemănătoare pentru celuloza microcristalină regenerată din [Emim]Ac sau [Emim]Cl [163]. Celuloza standard Avicel PH101 prezintă o bandă intensă la 3377 cm⁻¹ caracteristică legăturilor de hidrogen intramoleculare. După regenerarea celulozei din soluția de DMSO/[Emim]Ac s-a observat o deplasare a benzii de la 3377 cm⁻¹ la aproximativ 3441 cm⁻¹, aceasta probabil datorându-se formării de noi legături de hidrogen după regenerare. Caracteristici asemănătoare ale spectrului celulozei regenerate au fost observate și de Xiao ș.a. [112].

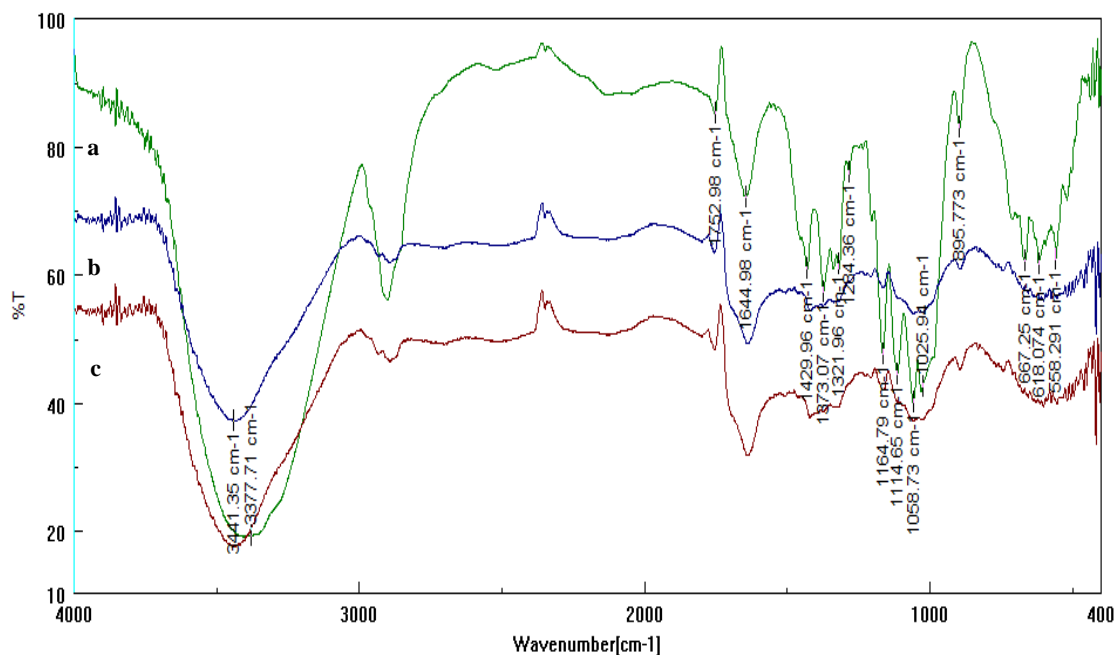


Figura II.9. Spectrul IR al celulozei recuperate din soluția de DMSO/[Emim]Ac (a) celuloză microcristalină Avicel PH101 (b) celuloza precipitată din biomasă standard, (c) celuloza din plop pretrat

Spectrul FT-IR al ligninei precipitate din soluția de DMSO/[Emim]Ac în urma dizolvării biomasei din rumeguș de plop și amestecului standard este asemănător cu cel al ligninei standard Kraft nedizolvate. Banda intensă de la 3416 cm^{-1} apare datorată grupării -OH, iar domeniul $2935\text{-}2839\text{ cm}^{-1}$ este caracteristic legăturilor C-H din grupările metil sau metilen.

Apariția benzilor de la 1730 cm^{-1} se datorează grupărilor carbonil din lignină. Benzile caracteristice scheletului aromatic au fost atribuite domeniului $1599\text{-}1424\text{ cm}^{-1}$, iar legăturile C-H aromatice apar la 845 cm^{-1} . Apariția benzilor de la $1267\text{-}1215\text{ cm}^{-1}$ pot fi atribuite vibrației grupării C-O din guaiacil și siringil iar benzile de la aproximativ 1080 cm^{-1} corespund legăturilor C-H din siringil și guaiacil. Rezultate similare au fost observate și de Sun ș.a. și Toledano ș.a. [125, 164].

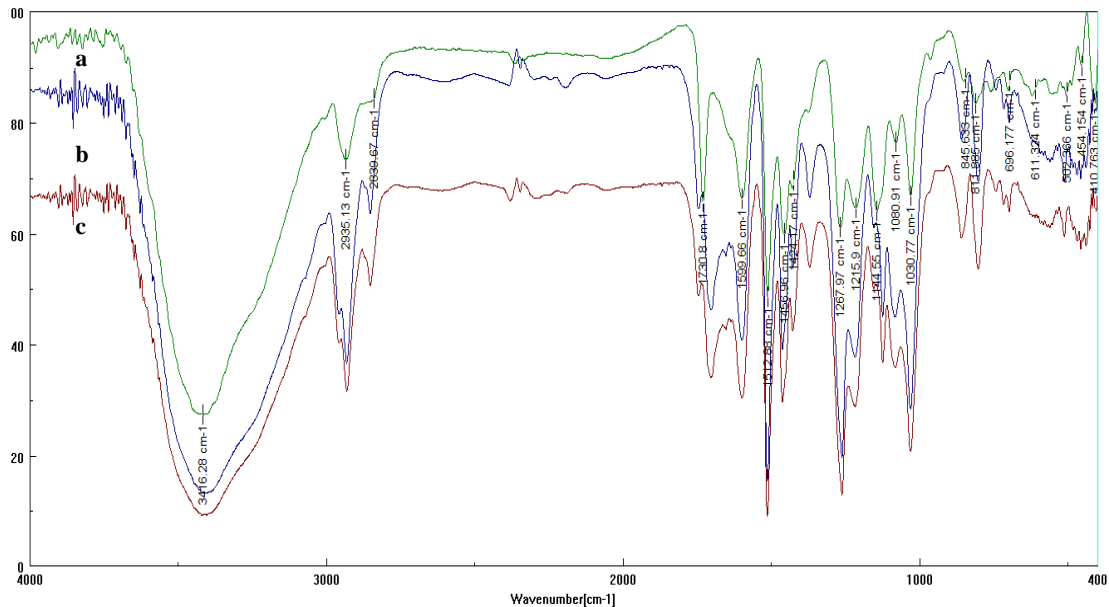


Figura II.10. Spectrul IR al ligninei precipitate din soluția de DMSO/[Emim]Ac
 (a) lignină standard Kraft nedizolvată, (b) lignină precipitată din biomasă standard
 (c) lignină precipitată din plop

II.2.5. Concluzii

- Prin pretratament cu acid sulfuric au rezultat cantități mai mari de zaharuri din esențele moi de lemn (25% din salcâm, respectiv 26% din brad), comparativ cu esențele tari (19% din plop și 21% din stejar), ceea ce este în concordanță cu conținutul în hemiceluloză al acestor tipuri de biomasă.
- În urma pretratamentului cu acid sulfuric diluat, a crescut randamentul de hidroliză a celulozei din salcâm, stejar și plop. În cazul rumegușului de brad, cantitatea de zahar obținută în urma hidrolizei enzimatice a celulozei din bradul pretratată a fost mai mică decât cantitatea de zahar eliberată din bradul netratat.
- Pretratamentul cu glicerină pură sau reziduală a dus la creșterea eficienței de hidroliză enzimatică a celulozei din biomasă, aceasta deoarece glicerina are capacitatea de a dizolva lignina din biomasă. Glicerina pură a dizolvat o cantitate mai mare de lignină din lemnul de esență moale comparativ cu lemnul de esență tare.
- Pretratamentul cu glicerină pură a dus în general la viteze de hidroliză mai mari comparativ cu cea reziduală, însă această viteză diferită de hidroliză nu a afectat productivitatea enzimei, după 24 de ore ajungându-se la aproximativ același grad de hidroliză.
- Lichidele ionice [Bmim][BF₄], [Bmim][PF₆] au fost ineficiente în pretratarea biomasei, cantitățile de zaharuri obținute pe tot parcursul reacției, în urma hidrolizei

enzimatice fiind aproximativ aceleași, sau chiar mai mici (în cazul stejarului și salcâmului) decât cantitățile de zaharuri obținute după hidroliza biomasei netratate.

- Pretratamentul cu lichidele ionice [Emim]Ac și [Emim]TFA au determinat creșterea cantității de zaharuri din celuloză, deoarece acestea au capacitatea de a dizolva lignina și celuloza din biomasă, iar după precipitare celuloza prezintă un grad de cristalinitate mai scăzut. Lichidul ionic [Emim]Ac a dizolvat o cantitate mai mare de lignină din biomasă decât lichidul ionic ce conține anionul trifluoroacetat. [Emim]Ac a fost capabil să dizolve, după 24 ore, aproximativ 48% lignină din rumegușul de salcâm, 21% lignină din brad, respectiv 36% din lemnul de esență tare de stejar și plop.

- Dintre cele patru lichide ionice testate, cel mai eficient lichid ionic folosit pentru pretratarea biomasei lignocelulozice a fost [Emim]Ac.

- Dintre cele patru tipuri de biomasă pretratate cu [Emim]Ac, plopul pretratată a fost hidrolizat cu eficiența cea mai mare.

- Dintre metodele simple de pretratare, pretratarea biomasei cu glicerină, respectiv [Emim]Ac a fost mai eficientă pentru hidroliza enzimatică a celulozei decât pretratarea cu acid sulfuric diluat. Nu s-au observat diferențe semnificative ale randamentelor de hidroliză, pe tot parcursul reacției, ale celulozei din biomasa de stejar pretratată cu [Emim]Ac, respectiv cu glicerină pură. În cazul rumegușului de salcâm, pretratarea cu glicerină pură a fost mai eficientă pentru hidroliza celulozei decât pretratarea biomasei cu [Emim]Ac. Pe tot parcursul reacției, randamentele de hidroliză ale bradului și plopului pretratată cu [Emim]Ac au fost mai mari decât ale biomasei pretratate cu glicerină pură.

- Pretratarea biomasei lignocelulozice prin metoda combinată cu acid sulfuric diluat/[Emim]Ac a fost mai eficientă pentru hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă, decât pretratarea simplă cu acid sulfuric, respectiv lichid ionic.

- Pretratarea biomasei lignocelulozice prin metoda combinată cu glicerină pură/[Emim]Ac a fost mai eficientă pentru hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă, decât pretratarea simplă cu glicerină, respectiv lichid ionic.

- Dintre metodele de pretratare combinate studiate, metoda combinată de pretratare cu glicerină/[Emim]Ac a fost cea mai eficientă pentru hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă decât metoda cu acid/[Emim]Ac, în ceea ce privește gradul final de hidroliză.

- Pentru a reduce costurile energetice, costurile de proces și pentru a preveni degradarea celulozei, în cazul pretratării biomasei cu soluția de DMSO/[Emim]Ac, s-a realizat optimizarea parametrilor care influențează dizolvarea biomasei în solvent: temperatura, timpul de operare și concentrația DMSO/[Emim]Ac.

- Soluția DMSO/[Emim]Ac în raport 50:50 (% , vol) a dizolvat complet celuloza Avicel și lignina standard după 6 ore de pretratare, în timp ce doar 57% celuloză, respectiv 23% lignină au fost dizolvate din rumegușul de plop pretratată.

- Soluția de DMSO/[Emim]Ac s-a reutilizat de 4 ori, însă capacitatea de dizolvare a celulozei și ligninei a scăzut după fiecare ciclu de utilizare. La al patrulea ciclu de utilizare solventul a dizolvat aproximativ 64% celuloză și 82% lignină din amestecul standard, respectiv 29% celuloză și 3% lignină din plopul pretratată.

- S-a precipitat o cantitate mai mare de lignină din solvent pentru proba de amestec standard, decât pentru proba de plop, indiferent de numărul de cicluri de utilizare.

- Analiza prin spectrofotometrie FT-IR a arătat că celuloza și lignina nu au suferit degradări structurale în timpul proceselor de dizolvare în amestecul DMSO/[Emim]Ac, urmată de reprecipitare. Micile diferențe observate între spectrul FT-IR ale celulozei regenerate și al celulozei standard Avicel PH101 se datorează scăderii gradului de cristalinitate al celulozei după dizolvare.

II.3. Imobilizarea celulozei prin tehnica entrapării în sol-gel

Celuloza este un complex enzimatic format din trei enzime (endoglucanaze, exoglucanaze și β -D-glucozidaze) care hidrolizează celuloza din biomasa lignicelulozică. Pentru îmbunătățirea performanțelor catalitice ale enzimei și creșterea cantității de zaharuri fermentescibile, celuloza s-a imobilizat prin tehnica entrapării în sol-gel. S-a recurs la imobilizarea prin tehnica sol-gel, deoarece comparativ cu alte metode aceasta prezintă o serie de avantaje: poate fi aplicată unui domeniu larg de enzime, stabilitate termică și chimică ridicată, flexibilitatea dimensiunii și geometriei porilor, se poate imobiliza o cantitate mare de proteină.

Preparatele imobilizate au fost obținute prin două metode, cu diferiți aditivi și silani precursori. Evaluarea eficienței imobilizării s-a realizat prin determinarea randamentului de imobilizare, activității catalitice și randamentului de regăsire a activității totale a preparatelor obținute. S-a realizat și compararea metodelor de imobilizare, optimizarea metodei de imobilizare alese și testarea preparatelor care au înregistrat cea mai bună activitate catalitică în reacția de hidroliză a celulozei microcristaline.

Preparatul care a înregistrat cea mai bună eficiență în reacția de hidroliză enzimatică a celulozei miscocristaline a fost folosit în studiile de stabilitate și reutilizare.

II.3.1. Influența precursorilor silanici și condițiilor de imobilizare asupra eficienței catalitice a celulozei imobilizate

S-a imobilizat celuloza Celluclast 1.5L de la Novozyme prin metoda entrapării în sol-gel utilizând diferiți precursori silanici tetrametoxisilan amestecat cu alchil- sau aril-trimetoxisilani în diferite rapoarte molare și diferiți aditivi [165]. Condițiile de imobilizare și proprietățile catalitice ale preparatelor enzimatic obținute sunt prezentate în Tabelul II.23, Tabelul II.24 și Tabelul II.25.

În Metoda I de entrapare s-au folosit atât amestecuri binare (doi silani precursori), de tetrametoxisilan în combinație cu metil- sau fenil-trimetoxisilan, în raport molar 1:1, cât și amestecuri ternare (trei silani precursori) de feniltrimetoxisilan, metiltrimetoxisilan și tetrametoxisilan, în raport molar 1,6:0,4:1. Rolul aditivilor în proces (lichidul ionic [Emim]BF₄, PEG, sau surfactantul TWEEN 80) a fost de a proteja enzima în timpul imobilizării și de a îmbunătăți proprietățile matricei. NaF a avut rol de catalizator în reacția de policondensare.

În Metoda II de imobilizare s-au folosit amestecuri de doi silani precursori, tetrametoxisilan în combinație cu metil-, 3-aminopropil-, N-2-aminoetil-3-aminopropil-trimetoxisilan și metiltrimetoxisilan amestecat cu N-2-aminoetil-3-aminopropil-trimetoxisilan, în diferite rapoarte molare. Pentru formarea solului apos, prin hidroliza silanilor precursori, în reacție s-a adăugat etanol pentru o omogenizare mai bună și acid clorhidric, care are rol de catalizator.

Pentru determinarea randamentului de imobilizare s-a calculat cantitatea de proteină din enzima nativă și cantitatea de proteină imobilizată. Conținutul de proteine a celulozei native Celluclast 1,5L a fost de **124 mg proteină/ml**. Randamentul de imobilizare s-a calculat prin diferența dintre cantitatea de proteină

inițială introdusă la imobilizare și cantitatea de proteină din filtratul rezultat după spălarea preparatului.

Tabelul II.23 și Tabelul II.24 prezintă cantitățile de proteină imobilizată și randamentele de imobilizare al preparatelor enzimatiche obținute.

Se observă că în urma imobilizării, cantități mari de proteină au fost reținute în matricea de gel, indiferent de condițiile folosite, randamentele de imobilizare variind de la 70 la 96%. Când s-a folosit Metoda I de entrapare, cele mai mari randamente de imobilizare (95-96%) s-au înregistrat la preparatele obținute cu cei trei silani precursori PhTMOS/MeTMOS/TMOS în raport molar 1,6:0.4:1 (Tabelul II.23) [165].

În cazul Metodei II de imobilizare, cel mai mare randament, de aproximativ 93%, l-a avut preparatul obținut cu MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1 și 0,2 ml celuloză introdusă la imobilizare. Natura silanilor precursori și raportul dintre acestea nu au avut influență semnificativă asupra randamentelor de imobilizare.

Tabelul II.23. Determinarea randamentului de imobilizare al preparatelor obținute în urma imobilizării prin Metoda I

Condiții de imobilizare		Cantitate proteină imobilizată (mg)	Randament imobilizare (%)
Silani precursori	Aditivi		
MeTMOS:TMOS= 1:1	[Emim]BF ₄	24,07	97.02
	PEG	22,33	90.04
	TWEEN 80	24,03	96.88
PhTMOS:TMOS= 1:1	[Emim]BF ₄	17,47	70.53
	PEG	21,51	86.70
	TWEEN 80	24,24	95.71
PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1.6:0.4:1	[Emim]BF ₄	19,53	78.75
	PEG	22,12	89.16
	TWEEN 80	24,24	95.74

Tabelul II.24. Determinarea randamentului de imobilizare al preparatelor obținute în urma imobilizării prin Metoda II

Condiții de imobilizare ^a	Cantitate proteină imobilizată (mg)	Randament imobilizare (%)
TMOS	20,61	83,07
MeTMOS:TMOS= 1:1	22,78	91,84
MeTMOS:TMOS= 2:1	21,75	87,66
MeTMOS:TMOS= 3:1	23,16	93,34
MeTMOS:TMOS= 4:1	22,22	89,57
MeTMOS:TMOS= 5:1	22,23	89,92
N-2-AET-3APrTMOS:TMOS=1:1	22,32	89,98
N-2-AET-3APrTMOS:TMOS=2:1	21,63	87,21
3APrTMOS:TMOS=1:1	20,42	82,32
3APrTMOS:TMOS=2:1	19,94	80,38
3APrTMOS:MeTMOS=1:1	21,79	87,90
3APrTMOS:MeTMOS=2:1	21,17	85,32

^a Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare a fost de 0,2 ml

II.3. Imobilizarea celulei prin tehnica entrapării în sol-gel 99

Pentru a determina activitatea catalitică a celulei native și imobilizate, s-a utilizat reacția de hidroliză a carboximetilcelulozei (CMC) în tampon acetat de sodiu pH 4,8. Activitatea catalitică s-a determinat prin măsurarea cantității de glucoză eliberate după 30 minute de reacție. Metoda de determinare a activității catalitice a celulei native și imobilizate a fost prezentată la paragraful III.3.2. Activitatea celulei native a fost de **57,34 $\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ enzimă**. Pentru a studia eficiența catalitică a preparatelor enzimatic obținute s-a calculat randamentul total de regăsire al activității, acesta fiind calculat în procente ca raportul dintre activitatea totală a celulei imobilizate și activitatea totală a celulei native introdusă la imobilizare.

Tabelul II.25. Proprietățile catalitice ale celulei imobilizate

Metoda	Condiții de imobilizare ^a		Activitate ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)	Rand total de reg. activitate (%)
	Silani precursori	Aditivi		
METODA I	MeTMOS:TMOS= 1:1	[Emim]BF ₄	0,14	0.60
		PEG	3,36	17.36
		TWEEN 80	3,74	18.49
	PhTMOS:TMOS= 1:1	[Emim]BF ₄	3,14	16.21
		PEG	6,24	30.23
		TWEEN 80	6,46	31.93
	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 1.6:0.4:1	[Emim]BF ₄	3,86	18.72
		PEG	9,28	38.97
		TWEEN 80	14,1	81.26
METODA II	TMOS	NaF, EtOH, HCl	9,44	40.38
	MeTMOS:TMOS= 1:1		9,86	44.63
	MeTMOS:TMOS= 2:1		15,00	84.88
	N-2-AET-3APrTMOS:TMOS =1:1		0,64	2,92
	N-2-AET-3APrTMOS:TMOS =2:1		0,31	1,35
	3APrTMOS:TMOS=1:1		1,32	5,74
	3APrTMOS:TMOS=2:1		0,96	4,18
	3APrTMOS:MeTMOS=1:1		1,52	6,47
	3APrTMOS:MeTMOS=1:1		1,09	4,67

a Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare pentru fiecare metodă a fost de 0,2 ml.

Pe baza datelor din Tabelul II.25 s-a realizat Figura II.11 și Figura II.12 care reprezintă efectul silanilor precursori asupra eficienței biocatalizatorului.

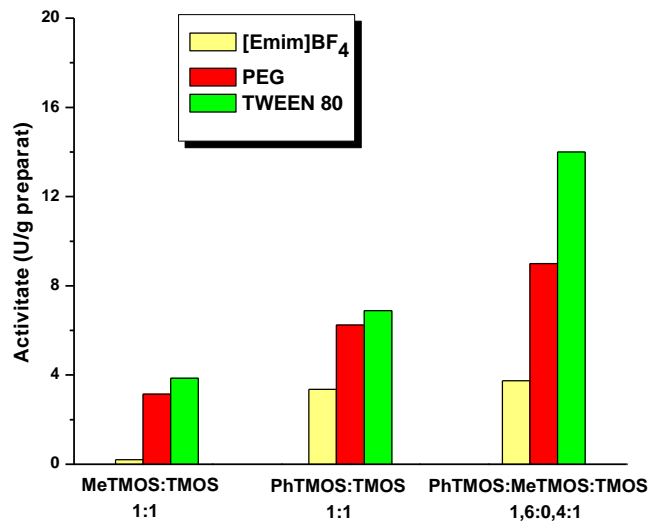


Figura II.11. Imobilizarea celulazei prin Metoda I în matrici siliconice de sol-gel ale silanilor precursori, la diferite rapoarte molare și cu diferiți aditivi

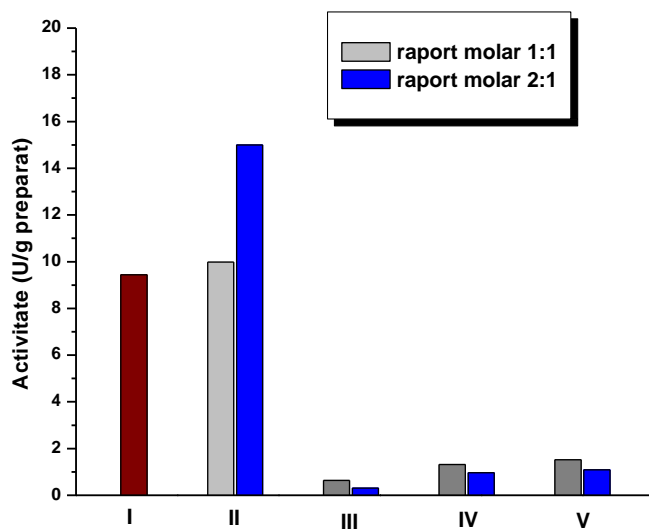


Figura II.12. Imobilizarea celulazei prin Metoda II în matrici siliconice de sol-gel ale silanilor precursori, la diferite rapoarte molare
 (I) TMOS; (II) MeTMOS/TMOS; (III) N-2-AEt-3APrTMOS/TMOS;
 (IV) 3APrTMOS/TMOS; (V) 3APrTMOS/MeTMOS

Proprietățile catalitice ale celulozei au fost puternic influențate de natura și concentrația grupărilor alchil sau aril nehidrolizabile ale silanilor precursori și a aditivilor [165]. Înlocuirea grupării alchil nehidrolizabile din amestecul de doi silani precursori MeTMOS/TMOS cu gruparea aril nehidrolizabilă (fenil) duce la creșterea activității catalitice. Folosirea amestecului de trei silani precursori PhTMOS/MeTMOS/TMOS în raport molar 1,6:0,4:1 în procesul de imobilizare a determinat îmbunătățirea eficienței catalitice a celulozei, comparativ cu amestecul de doi silani, indiferent de aditivii adăugați. Cu toate acestea, aditivii au avut un rol important în entraparea enzimei în matricea de sol-gel, aceștia influențând proprietățile catalitice ale celulozei. La adăugarea surfactantului TWEEN 80, activitatea catalitică a crescut, pentru toate cele trei amestecuri de silani folosite (Figura II.11). Astfel, la entraparea enzimei în matrici siliconice de PhTMOS/MeTMOS/TMOS, activitatea catalitică a preparatului a fost de 14,00 U/g preparat când s-a folosit TWEEN 80 ca aditiv, comparativ cu 9,28 U/g preparat când s-a folosit PEG ca aditiv. Utilizarea lichidului ionic [Emim]BF₄ ca aditiv în procesul de entrapare în sol-gel a dus la obținerea de activități celulozice scăzute, comparativ cu ceilalți aditivi. Aceasta s-a datorat faptului că lichidele ionice inactivează celuloza. Influența lichidelor ionice asupra activității catalitice a celulozei a fost studiată la paragraful II.4.6. Dintre preparatele enzimice obținute prin Metoda I, cel mai eficient a fost celuloza entrapată în sol-gel când s-a folosit amestecul de trei silani precursori PhTMOS/MeTMOS/TMOS în raport molar 1,6:0,4:1 și aditivul TWEEN 80, randamentul total de regăsire al activității catalitice fiind cel mai mare în acest caz (81%).

În cazul utilizării Metodei II de imobilizare, creșterea conținutului de MeTMOS în amestecul de silani precursori a dus la creșterea activității catalitice (Figura II.12). La entraparea enzimei în matrici siliconice de sol-gel, activitatea catalitică a preparatului a crescut de la 9,86 U/g preparat când raportul amestecului de silani MeTMOS/TMOS a fost de 1:1, la 15,00 U/g preparat când raportul silanilor a fost de 2:1. Folosirea silanilor cu grupări amino (3-aminopropil-trimetoxisilan, respectiv N-2-aminoetil-3-aminopropil-trimetoxisilan), a dus la scăderea semnificativă a eficienței catalitice.

Creșterea concentrației silanilor 3-aminopropil-, N-2-aminoetil-3-aminopropil-trimetoxisilan a determinat scăderea activității celulozice. Comparând cele două metode de imobilizare, s-a observat că celuloza entrapată prin Metoda II, când s-au utilizat silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 2:1 a avut cea mai bună activitate catalitică și un randament total de regăsire al activității enzimice de 85% [165].

II.3.2. Stabilirea condițiilor optime de imobilizare pentru metoda de entrapare selectată

Entraparea în matrici siliconice hibride este o metodă de imobilizare foarte flexibilă și permite selecția celor mai bune condiții de imobilizare, ținându-se seama de proprietățile structurale și funcționale ale fiecărei enzime.

Celuloza imobilizată prin Metoda II de entrapare cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 2:1 a avut cea mai bună activitate catalitică, comparativ cu celelalte preparate obținute, de aceea s-a ales ca această metodă să se optimizeze prin modificarea raportului silanilor precursori și cantității de enzimă introdusă la imobilizare [165].

II.3.2.1. Influența raportului molar al silanilor precursori

Deoarece la modificarea raportului silanilor precursori MeTMOS/TMOS de la 1:1 la 2:1, activitatea catalitică și randamentul total de regăsire al activității au crescut semnificativ (84,9% la un raport al silanilor de 2:1, comparativ cu 44,6% pentru un raport de 1:1), s-au studiat proprietățile catalitice ale enzimei imobilizate la modificarea raportului de MeTMOS/TMOS. Pentru a îmbunătăți performanțele catalitice ale celulazei imobilizate s-a determinat raportul molar optim al silanilor precursori. Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în Tabelul II.26.

Tabelul II.26. Proprietățile catalitice ale celulazei entrapate în matrici siliconice de sol-gel, la diferite rapoarte molare ale silanilor precursori

Condiții de imobilizare ^a	Activitate ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)	Randament total de reg. activitate (%)
MeTMOS:TMOS= 1:1	9,86	44.63
MeTMOS:TMOS= 2:1	15,00	84.88
MeTMOS:TMOS= 3:1	20,15	92.07
MeTMOS:TMOS= 4:1	18,94	88.97
MeTMOS:TMOS= 5:1	18,10	87.92

^a cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare a fost de 0,2 ml.

Creșterea concentrației grupărilor metil în amestecul de silani precursori a fost benefică până la un raport molar 3:1 al silanilor precursori. Depășirea acestei valori a determinat mici scăderi ale activității preparatelor enzimice obținute. Celulaza entrapată prin utilizarea silanilor precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1 a avut cea mai bună activitate catalitică și un randament total de regăsire al activității enzimice de peste 92% [165].

II.3.2.2. Influența încărcării cu enzimă

În cazul preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea celulazei prin entrapare în sol-gel folosind ca silani precursori MeTMOS și TMOS în raport molar 3:1, s-a obținut valoarea cea mai mare a activității catalitice. Această valoare fost corelată cu un randament de imobilizare de aproximativ 92%. S-a studiat efectul încărcării cu enzimă asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului, prin evaluarea eficienței catalitice a celulazei imobilizate pentru un domeniu de 7 concentrații de proteină introdusă la imobilizare (6,20; 12,40; 24,81; 37,20; 49,60, 62,00; 74,40 mg proteină).

Pentru determinarea activității catalitice a celulazei imobilizate s-a utilizat metoda cu acid 3,5-dinitro-salicilic, descris la punctul III.3.2, însă cu modificarea cantității de biocatalizator. Tabelul II.27 prezintă rezultatele activității celulazei imobilizate în matrici siliconice de sol-gel folosind diferite cantități de enzimă introdusă.

II.3. Imobilizarea celulozei prin tehnica entrapării în sol-gel 103

Tabelul II.27. Proprietățile catalitice ale celulozei imobilizate prin entrapare în MeTMOS/TMOS la raport molar 3:1, la diferite cantități de enzimă

Proteină supusă imobilizării (mg)	Încărcare cu enzimă ^a (mg enzimă/g preparat)	Randament imobilizare (%)	Activitate ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)	Randament total de regăsire al activității (%)
6,20	11,60	95,47	9,69	172,47
12,40	21,92	92,48	16,85	153,68
24,81	44,46	93,22	20,52	93,04
37,20	67,98	91,37	19,58	56,91
49,60	86,85	90,53	22,88	51,57
62,00	102,55	82,87	21,09	36,85
74,40	101,57	71,75	23,16	34,86

^a S-a calculat ca raport dintre cantitatea totală de proteină imobilizată pe 1 g preparat

În Tabelul II.27 se poate observa că până la o încărcare cu enzimă de aproximativ 87 mg/g preparat, randamentul de imobilizare este practic independent de cantitatea de celulază folosită la imobilizare (aproximativ 92%), însă prin creșterea încărcării cu enzimă la 102 mg/g acest randament scade la aproximativ 71%.

Activitatea catalitică a celulozei entrapate a crescut până la o încărcare de 44,46 mg enzimă/g preparat, atingând o valoare de aproximativ 20 U/g preparat, după care s-a menținut aproximativ constantă. Randamentul total de regăsire al activității catalitice a scăzut cu creșterea încărcării cu enzimă, de la 93% pentru o încărcare de 44,46 mg/g preparat la 36% când aceasta a fost 101 mg/g preparat [165].

Preparatele enzimaticе obținute cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1 și 12,40, respectiv 24,81 mg proteină introdusă la imobilizare, s-au folosit în continuare pentru studiul hidrolizei enzimaticе a celulozei microcristaline Avicel PH101, având proprietăți catalitice mai bune decât restul preparatelor.

II.3.3. Testarea preparatelor imobilizate pe substrat de celuloză microcristalină

Performanțele catalitice ale preparatelor enzimaticе obținute în urma imobilizării prin tehnica sol-gel au fost studiate în reacția de hidroliza enzimatică a celulozei microcristaline Avicel PH101, pentru a stabili condițiile în care aceștia manifestă cele mai bune performanțe catalitice în reacția de hidroliză a celulozei și cea mai mare stabilitate. Pentru aceasta, în reacția de hidroliză a celulozei s-au testat preparatele enzimaticе care au înregistrat cea mai bună activitate catalitică.

Schema hidrolizei enzimaticе a celulozei catalizată de celuloze este prezentată în Figura II.13.

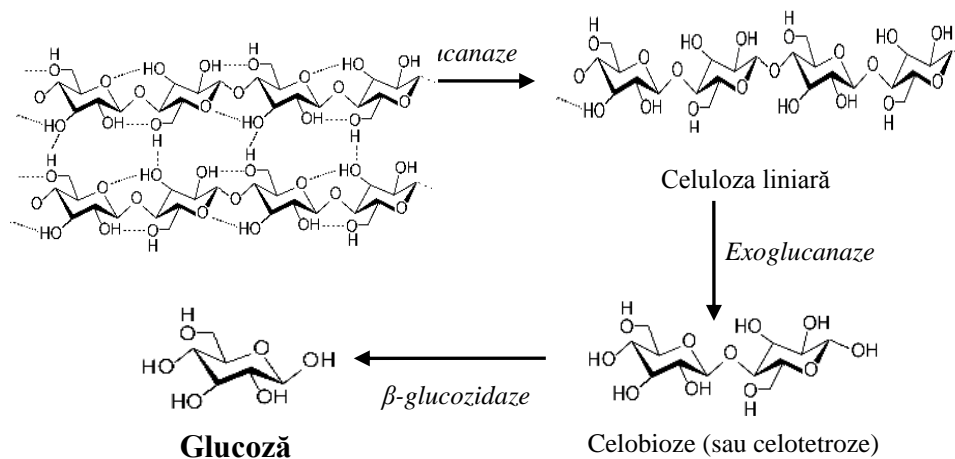


Figura II.13. Schema hidrolizei enzimatice a celulozei

10 mg/ml celuloză Avicel PH101 s-a hidrolizat enzimatic utilizând 5 μ l/ml celuloză nativă (0,62 mg proteină/ml), respectiv 10 mg/ml celuloza imobilizată (0,44 mg proteină/ml). Volumul reacției a fost menținut la 10 ml. S-au prelevat probe la anumite intervale de timp, iar cantitatea totală de zaharuri reducătoare (exprimată ca glucoză echivalentă) eliberată în timpul reacției de hidroliză s-a determinat cu ajutorul metodei prezentate la paragraful III.3.4. Pe baza determinărilor efectuate, s-a calculat randamentul de hidroliză la fiecare moment al reacției, rezultatele obținute fiind prezentate în Tabelul II.28 și Tabelul II.29. Prin hidroliza a 10 mg/ml celuloză microcristalină catalizată de celuloza nativă, s-au obținut 11,9 mg/ml zaharuri, valoare care s-a utilizat ca referință.

Tabelul II.28. Hidroliza enzimatică a celulozei microcristaline Avicel PH101 catalizată de celuloza imobilizată prin Metoda I de entrapare în matrici de sol-gel

Condiții de imobilizare		Cantitate totală de zaharuri (mg/ml)				
Silani precursori	Aditivi	2 ore	4 ore	6 ore	8 ore	24 ore
MeTMOS:TMOS= 1:1	[Emim]BF ₄	0,03	0,12	1,13	0,21	0,25
	PEG	0,20	0,27	0,36	0,39	0,48
	TWEEN 80	0,33	0,51	0,66	0,72	0,80
PhTMOS:TMOS= 1:1	[Emim]BF ₄	0,11	0,25	0,35	0,42	0,85
	PEG	0,29	0,45	0,54	0,67	1,06
	TWEEN 80	0,36	0,59	0,71	0,80	1,20
PhTMOS:MeTMOS:TMO S= 1.6:0.4:1	[Emim]BF ₄	0,25	0,41	0,48	0,59	1,02
	PEG	0,67	0,84	1,08	1,43	2,89
	TWEEN 80	0,54	0,94	1,28	1,75	4,02
Celuloza nativă		3,03	5,88	7,06	8,17	10,19

II.3. Imobilizarea celulozei prin tehnica entrapării în sol-gel 105

Tabelul II.29. Hidroliza enzimatică a celulozei microcristaline Avicel PH101 catalizată de celuloza imobilizată prin Metoda II de entrapare în matrici de sol-gel

Condiții de imobilizare	Cantitate totală de zaharuri (mg/ml)				
	2 ore	4 ore	6 ore	8 ore	24 ore
MeTMOS:TMOS= 1:1	0,37	0,87	1,08	1,42	3,14
MeTMOS:TMOS= 2:1	1,07	1,74	2,33	2,84	4,54
MeTMOS:TMOS= 3:1, 0,1 ml enzimă	0,71	1,04	1,42	2,09	3,01
MeTMOS:TMOS= 3:1, 0,2 ml enzimă	1,52	1,98	2,57	3,38	5,92
MeTMOS:TMOS= 4:1	1,54	1,89	2,38	3,45	5,17
MeTMOS:TMOS= 5:1	1,19	1,65	2,26	3,21	4,92
Celuloza nativă	3,03	5,88	7,06	8,17	10,19

Pentru a ilustra mai bine influența condițiilor de imobilizare asupra hidrolizei enzimatică a celulozei, rezultatele obținute după 24 de ore de hidroliză sunt prezentate și în diagramele din Figura II.14.

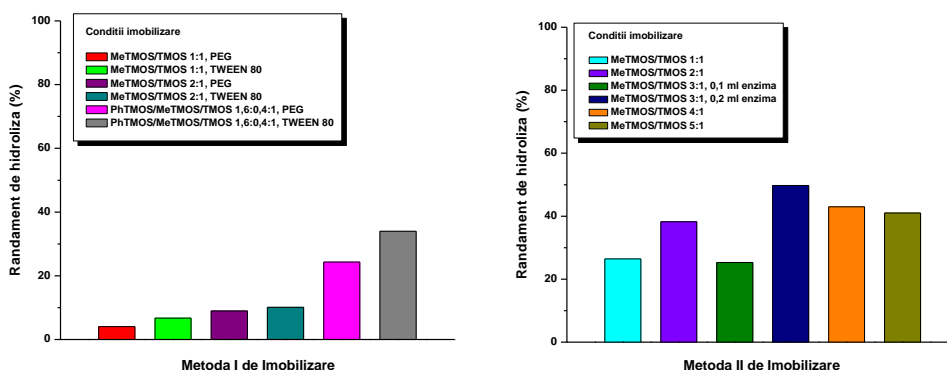


Figura II.14. Influența condițiilor de imobilizare asupra randamentului de hidroliză al substratului Avicel PH101, după 24 ore de reacție.

Celuloza imobilizată cu un amestec de trei silani precursori PhTMOS/MeTMOS/TMOS în raport molar 1,6:0,4:1 și aditivul TWEEN 80 a fost cel mai eficient în hidroliza enzimatică a celulozei, comparativ cu celelalte preparate obținute prin Metoda I de imobilizare folosind amestecuri de doi silani precursori, MeTMOS și TMOS și aditivii PEG sau TWEEN 80. Toate preparatele în care s-a folosit la imobilizare surfactantul TWEEN 80 ca aditiv, au determinat creșterea randamentelor de hidroliză.

În cazul preparatelor obținute prin Metoda II de entrapare în sol-gel, preparatul care a dus la obținerea celui mai ridicat randament de hidroliză a fost cel în care s-a folosit amestecul de silani precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1 și 0,2 ml enzimă introdusă. Dintre toate preparatele testate, acesta a înregistrat cea mai mare activitate catalitică și a fost cel mai eficient în reacția de hidroliză a celulozei. S-au comparat performanțele catalitice în reacția de hidroliză a celulozei, ale preparatelor obținute cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1 și o cantitate de enzimă adăugată la imobilizare de 0,1 ml, respectiv 0,2 ml. După 24 ore de reacție, preparatul celulozic obținut prin adăugarea la imobilizare a unei cantități de 0,2 ml enzimă (activitatea catalitică a fost de 20 U/g preparat) a fost

capabil să hidrolizeze aproximativ 50% din celuloza microcristalină Avicel, după 24 ore de hidroliză, comparativ cu preparatul la care se folosește 0,1 ml enzimă la imobilizare (16 U/g preparat), care a hidrolizat aproximativ 25% din celuloză (Tabelul II.29). Toate rezultatele au fost în acord cu activitatea celulazică a preparatelor, testată pe carboximetilceluloză [165].

Evoluția în timp a reacțiilor de hidroliză a celulozei, catalizată de celuloza nativă și preparatele imobilizate care au înregistrat cea mai bună activitate catalitică, poate fi urmărită în Figura II.15.

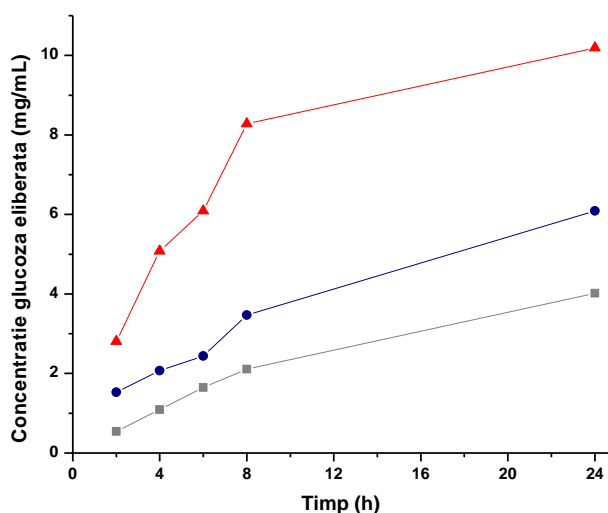


Figura II.15. Evoluția în timp a hidrolizei enzimatică a celulozei catalizată de celuloza nativă și imobilizată -■- Celuloza imobilizată prin Metoda I utilizând PhTMOS:MeTMOS:TMOS în raport molar 1.6:0.4:1 și TWEEN 80 -●- Celuloza imobilizată prin Metoda II utilizând MeTMOS:TMOS în raport molar 3:1 și 0,2 ml enzimă -▼- Celuloza nativă

Din Figura II.15 se observă că atât în cazul celulozei imobilizate cât și a celulozei native randamentul de hidroliză a crescut în timp, până la 24 ore de reacție. Folosirea celulozei imobilizate determină obținerea unor cantități mai mici de zaharuri, comparativ cu enzima nativă, pe tot parcursul hidrolizei, însă celuloza imobilizată prezintă o serie de alte avantaje, cum sunt stabilitatea ridicată și posibilitatea de reutilizare a enzimei, așa cum s-a demonstrat în studiile ulterioare. Sunt dificil de comparat performanțele catalitice ale enzimei native și imobilizate, deoarece cantitatea de proteină din matricea de sol-gel poate fi doar indirect determinată. În reacțiile de hidroliză s-a introdus 5μl/ml celuloză nativă ce conține 0,62 mg/ml proteină, respectiv 10 mg/ml celuloză imobilizată ce conține aproximativ 0,44 mg/ml proteină, ceea ce înseamnă că s-a utilizat cu 40% mai multă celuloză nativă pentru a hidroliza aceeași cantitatea de celuloză. Obținerea unui randament de hidroliză mai scăzut în cazul utilizării celulozei entrapate în sol-gel probabil se datorează și difuziunii îngreunată a substratului în matricea de gel.

Celuloza imobilizată prin Metoda II a dus la obținerea unor cantități mai mari de zaharuri, randamentul de hidroliză după 24 ore de reacție fiind de aproximativ 50%, comparativ cu 33% când la utilizarea enzimei imobilizate prin Metoda I.

Dintre toate preparatele testate, preparatul celuleic obținut prin Metoda II de imobilizare cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1 și 0,2 ml enzimă introdusă a avut cea mai bună activitate catalitică și a fost cel mai eficient în reacția de hidroliză enzimatică, de aceea acesta s-a folosit în studiile următoare de stabilitate și reutilizare [165].

II.3.4. Studiul reproductibilității metodei de imobilizare sol-gel

Imobilizarea prin entrapare în sol-gel depinde de un mare număr de parametri, de aceea este importantă verificarea reproductibilității metodei alese. Studiul reproductibilității metodei de imobilizare a fost realizat cu preparatul obținut prin metoda II cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1 și 0,2 enzimă introdusă. În acest scop, experimentul de imobilizare a fost repetat de 4 ori în aceleași condiții iar preparatele obținute au fost testate în reacția de hidroliză a carboximetilcelulozei (CMC). Rezultatele sunt prezentate în Tabelul II.30. Experimentele realizate au demonstrat o reproductibilitate ridicată a metodei de imobilizare prin metoda sol-gel, abaterea medie fiind de cel mult 8%, ceea ce pentru acest tip de imobilizare este un rezultat foarte bun.

Tabelul II.30. Studiul reproductibilității metodei de imobilizare prin metoda sol-gel

Nr. Imobilizare	Randament de imobilizare (%)	Activitate ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)	Abaterea medie ^a (%)	Randament total de regăsire al activității (%)
1	93,34	20,15	3,8	92,07
2	90,41	19,98	4,6	87,11
3	94,04	21,03	0,4	96,09
4	93,45	22,66	8,1	102,55

^a calculată față de valoarea medie a activității celor 4 preparate ($20,95 \mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)

II.3.5. Caracterizarea imagistică a celulei entrapate în sol-gel prin microscopie cu fluorescență

Pentru a observa distribuția celulei în interiorul matricei de sol-gel formate s-a folosit microscopia cu fluorescență. Celulaza Celluclast 1.5L a fost marcată cu un fluorocrom (izotiocianat de fluoresceină). Izotiocianatul de fluoresceină (FITC) este un compus care conține o moleculă de fluoresceină funcționalizată cu o grupare izocianat reactivă. Grupările izocianat reacționează cu grupările amino primare, imidazoil, tirozil sau carbonil din structura proteinelor. Doar derivații formați cu grupările amino primare sunt stabili. Reprezentarea schematică a complexului celulază-FITC este prezentată în Figura II.16.

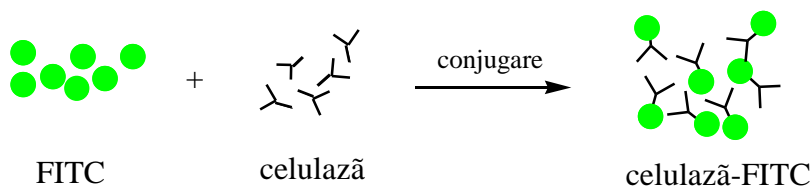


Figura II.16. Reprezentarea schematică a complexului celulază-FITC

Metoda de marcare a proteinelor cu fluorocromi a fost descrisă la paragraful III.3.6. Izocianatul de fluoresceină nereacționat a fost separat de soluția de proteină legată de fluoresceină prin spălarea repetată a probei cu apă distilată. Frațiunile colectate s-au analizat prin spectroscopia UV-VIS pe domeniul 350-600 nm. S-a observat (Figura II.17) o scădere a absorbției până la 0,1125, la lungimea de undă de 493 nm, corespunzătoare FITC, ceea ce înseamnă că s-a separat fluoresceina nereacționată.

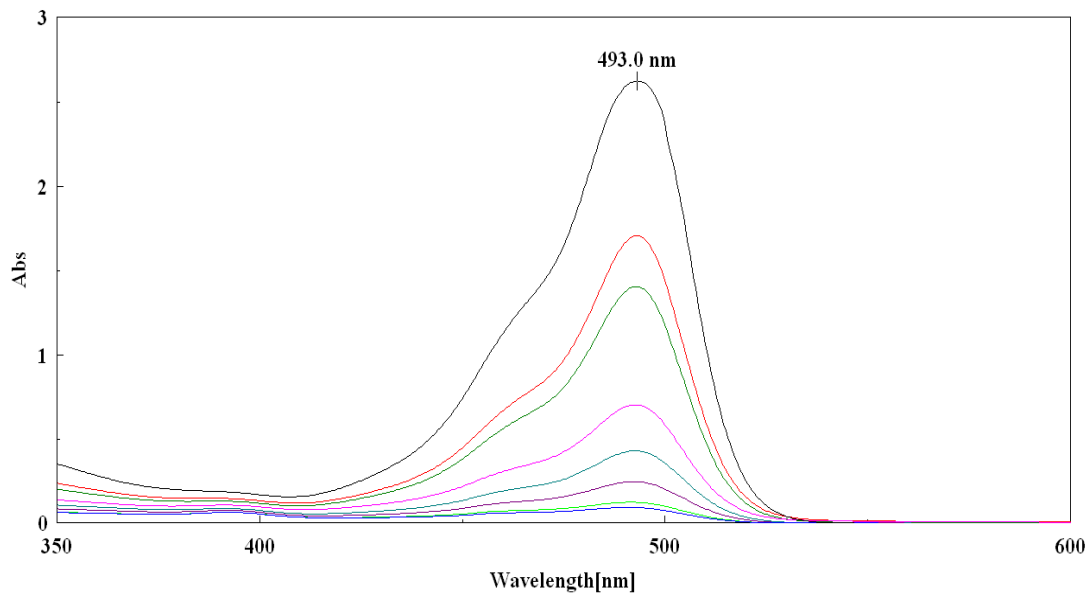


Figura II.17. Spectrul UV-VIS înregistrat în timpul colectării FITC nereacționate.

0,2 ml suspensie ce conține celulaza legată de soluția de fluoresceină s-a imobilizat prin Metoda II de entrapare în sol-gel utilizând silanii precursori MeTMOS:TMOS în raport molar 3:1. Imaginea fluorescentă a complexului celulază-FITC imobilizat în matrici de MeTMOS/TMOS este prezentată în Figura II.18 b. Pentru comparație, s-a realizat încă un experiment de control în care complexul celulază-FITC s-a înlocuit cu gelul martor. Preparatul control obținut cu aceiași silani precursori, a fost prezentat în Figura II.18.a.

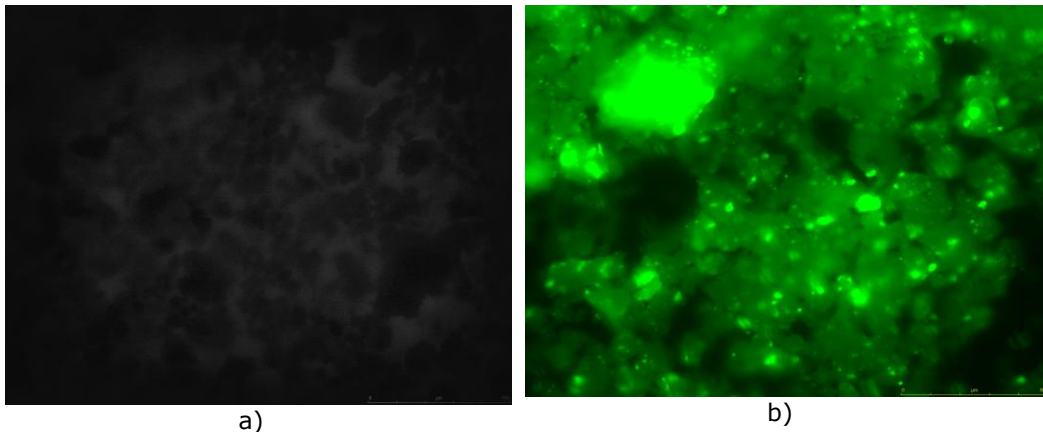


Figura II.18. Imaginile fluorescente ale preparatelor enzimatiche obținute cu MeTMOS/TMOS (raport molar 3:1)
a. gel martor; b. Celulază-FITC.

S-a observat că doar complexul celulază-FITC a prezentat fluorescență, lucru confirmat de absența acesteia în preparatul realizat pentru control (Figura II.18 a). Imaginile obținute prin spectroscopia cu fluorescență demonstrează distribuția celulozei în toată matricea de sol-gel, chiar dacă această distribuție nu poate fi uniformă, ținând cont de particularitățile metodei de imobilizare (Figura II.18 b).

II.3.6. Concluzii

- S-a realizat imobilizarea eficientă a celulozei din *Trichoderma reesei* indiferent de metodele și condițiile de imobilizare folosite, randamentele de imobilizare variind între 70-96%.
- Dintre preparatele obținute prin metoda I de imobilizare, preparatul celulozic care a înregistrat cea mai mare activitate catalitică, a fost cel obținut cu amestecul de trei silani precursori feniltrimetoxisilan/metiltrimetoxisilan/tetrametoxisilan în raport molar 1,6:0,4:1 și TWEEN80. Surfactantul TWEEN80 s-a dovedit a fi cel mai eficient aditiv, indiferent de amestecul de silani precursori folosit la imobilizare.
- În cazul metodei II de imobilizare, creșterea concentrației silanului precursor MeTMOS a determinat creșterea activității catalitice. Folosirea silanilor cu grupări amino a dus la scăderea semnificativă a eficienței catalitice. Preparatul celulozic obținut cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 2:1 a avut cea mai mare activitate catalitică.
- Deoarece, preparatul enzimatic obținut prin Metoda II de imobilizare cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 2:1 a înregistrat cea mai bună eficiență catalitică, această metodă s-a optimizat prin modificarea raportului silanilor precursori și cantității de enzimă introdusă la imobilizare. Preparatul celulozic care a înregistrat cea mai mare activitate catalitică, a fost cel obținut cu silanii precursori MeTMOS/TMOS de 3:1 și 44,46 mg enzimă/g preparat.
- În reacția de hidroliză a celulozei microcristaline Avicel PH101, cel mai eficient preparat care a determinat obținerea celui mai mare randament de hidroliză de aproximativ 50%, după 24 ore de reacție, a fost cel obținut prin metoda II de entrapare în sol-gel, în care s-a folosit amestecul de silani precursori MeTMOS/TMOS

în raport molar 3:1 și 44,46 mg enzimă/g preparat. Acest preparat a fost și cel mai eficient catalitic și s-a utilizat în studiile de stabilitate și reutilizare.

- Experimentele realizate au demonstrat o reproductibilitate ridicată a metodei de imobilizare sol-gel.
- Conform imaginilor realizate prin microscopia cu fluorescență s-a observat distribuția celulei în matricea de sol-gel.

II.4. Studiul stabilității celulei imobilizate

II.4.1. Stabilitatea la diferite valori de pH

Deoarece enzimele sunt stabile doar într-un anumit interval de pH s-a urmărit stabilirea valorii de pH la care eficiența catalitică este maximă [165]. Pentru alegerea pH-ului optim de reacție s-a studiat hidroliza enzimatică a CMC în soluție tampon acetat de sodiu de diferite pH-uri cuprinse între 4,2-7,4. Pentru acest studiu s-a utilizat preparatul enzimatic obținut în urma imobilizării în sol-gel utilizând silanii precursori MeTMO:TMOS în raport molar 3:1 și 0,2 ml enzimă, acesta având cea mai ridicată activitate catalitică. Pentru comparație, același studiu a fost realizat și pentru celula nativă Celluclast 1.5L. Influența pH-ului asupra activităților catalitice este prezentată în Tabelul II.31.

Tabelul II.31. Influența pH-ului asupra activității enzimatică a celulei native și imobilizate

pH	Activitate celulază nativă ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ enzimă)	Activitate celulază imobilizată ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)
4,2	42,59	18,40
4,8	51,03	19,98
5,2	55,07	16,89
6,0	25,36	16,17
6,4	22,18	15,36
6,8	17,81	15,28
7,4	16,60	8,84

Pe baza datelor din Tabelele II.31 s-au calculat activitățile enzimatică relative, exprimată în procente, ca raportul dintre activitatea reziduală și valoarea la care activitatea a fost maximă. Figura II.19 prezintă activitatea relativă a celulei native și imobilizate la diferite valori ale pH-ului, în intervalul 4,2-7,5.

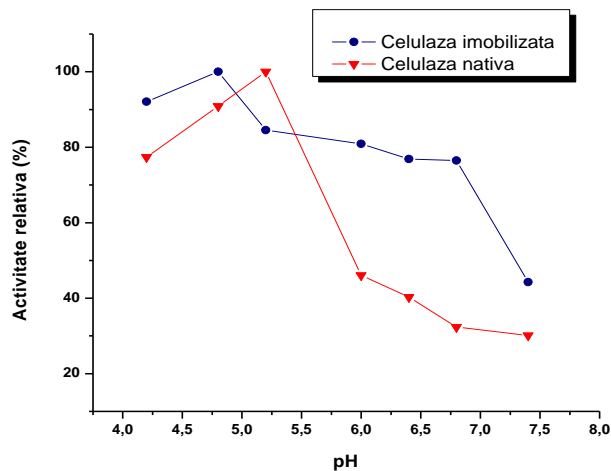


Figura II.19. Efectul pH-ului asupra eficienței catalitice a celulazei

Celulaza nativă a avut activitatea maximă la pH 5,2, iar peste această valoare activitatea a scăzut semnificativ. În cazul celulazei imobilizate, valoarea pH-ului la care eficiența catalitică a fost cea mai ridicată a scăzut la 4,8, însă după imobilizare celulaza a fost stabilă pe un domeniu mai larg de pH (6,2-7,4). Creșterea stabilității celulazei în domeniul slab bazic după imobilizare se datorează protejării enzimei de matricea de gel formată. Scăderea pH-ului optim după imobilizarea celulazei a fost observată și de alți cercetători. Celulaza din *Trichoderma reesei* imobilizată pe silice funcționalizată a avut activitatea maximă la pH 4,6, iar celulaza nativă la 4,8 [75]. Darias ș.a. au relatat că celulaza din *Trichoderma viridae* imobilizată prin legare covalentă de chitosan și celulaza nativă a avut activitatea optimă la pH 3,2 [69]. În cazul altei celulaze, din *Bacillus subtilis*, atât celulaza nativă cât și cea imobilizată au înregistrat activitate catalitică maximă la pH 6.0 [79].

Deoarece nu s-au înregistrat diferențe semnificative ale activităților celulazei native la pH 4,8 și pH 5,2 (activitatea celulazei native scade cu aproximativ 10% la pH 4,8), studiile următoare au fost realizate la pH 4,8, la care activitatea enzimei imobilizate a fost cea mai mare.

II.4.2. Stabilitatea termică

Deoarece modificarea temperaturii poate produce inactivarea enzimelor, alegerea temperaturii la care celulaza are activitatea catalitică maximă este foarte importantă. Alegerea temperaturii la care activitatea celulazei native și imobilizate este optimă s-a determinat prin hidroliza enzimatică a carboximetilcelulozei (CMC) la diferite temperaturi [165]. În acest studiu s-a folosit același preparat enzimatic, obținut prin Metoda II de imobilizare cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1.

Activitatea celulazei native și imobilizate s-a determinat prin adăugarea a 5 $\mu\text{l/ml}$ celulază nativă și 50 mg/ml celulaza imobilizată în 2% soluție de carboximetilceluloză, reacția având loc la diferite temperaturi cuprinse între

30-90°C. Activitatea celulozei s-a calculat după 30 minute de reacție. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul II.32.

Tabelul II.32. Influența temperaturii asupra activității enzimice a celulozei native și imobilizate

Temperatură (°C)	Activitatea celulozei native ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ enzimă)	Activitatea celulozei imobilizate ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)
30	30,11	13,46
40	36,62	16,71
50	54,32	21,03
60	47,31	19,32
70	43,50	18,61
80	27,27	14,71
90	10,94	5,25

Pe baza datelor din Tabelele II.32 s-au calculat activitățile enzimice relative. Figura II.20 prezintă activitatea relativă a celulozei native și imobilizate la diferite temperaturi, în intervalul 30-90°C.

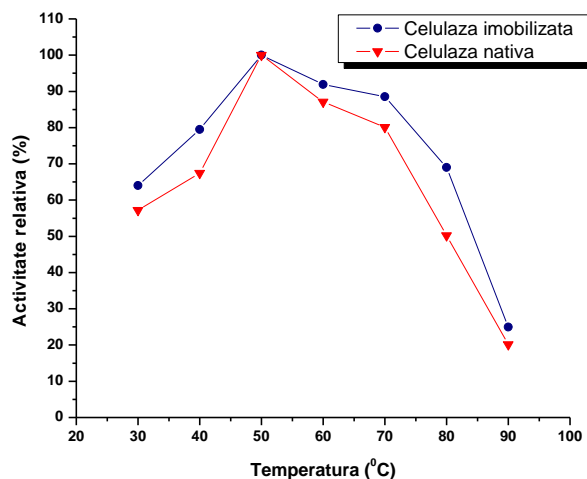


Figura II.20. Efectul temperaturii asupra eficienței catalitice a celulozei folosind ca substrat CMC

Atât pentru celuloza nativă cât și pentru cea imobilizată activitatea enzimică maximă s-a înregistrat la temperatura de 50°C. Menținerea după imobilizare a aceleiași temperaturi la care activitatea este maximă a fost observată și în cazul altor celuloze. Dinćer ș.a. au găsit că celuloza nativă din *Aspergillus niger* și celuloza imobilizată prin legare covalentă de chitosan, au avut activitatea catalitică maximă la 40°C [67]. Un element pozitiv este creșterea stabilității celulozei în urma imobilizării prin tehnica entrapării în sol-gel, cu 10-20% la temperaturi cuprinse în intervalul 60-80°C. Îmbunătățirea stabilității celulozei după imobilizare, la temperaturi mai mari de 70°C a fost raportată și de Xu ș.a. [166].

S-a studiat influența temperaturii asupra eficienței catalitice a celulozei native și imobilizate în reacția de hidroliză a celulozei microcristaline Avicel PH101

[165]. Pentru acest studiu 10 mg/ml Avicel PH101 s-au hidrolizat enzimatic timp de 24 ore în tampon acetat de sodiu pH 4,8, 0,05 M, la diferite temperaturi (30-70°C) utilizând 5 µl/ml celulază nativă (conține 0,62 mg proteină/ml), respectiv 10 mg/ml preparat imobilizat (conține 0,44 mg proteină/ml).

Figura II.21 reprezintă influența temperaturii asupra randamentului de hidroliză al celulozei, catalizată de celulaza nativă și imobilizată.

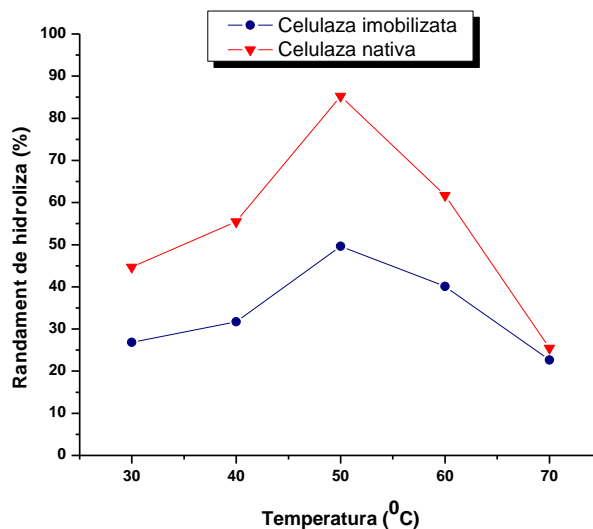


Figura II.21. Influență temperaturii asupra reacției de hidroliză a celulozei, catalizate de celulaza nativă și imobilizată prin Metoda II cu MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1

Din Figura II.21. se observă că ambii biocatalizatori utilizați, celulaza nativă și preparatul celulozic obținut în urma imobilizării, au avut eficiența catalitică maximă, în reacția de hidroliză a celulozei Avicel PH101, la temperatura de 50°C. Aceeași valoare a temperaturii optime s-a obținut și în cazul studiului pe carboximetilceluloză ca substrat (Figura II.20). Valoarea cea mai mare a randamentului de hidroliză, calculat după 24 ore de reacție, s-a atins la această temperatură (50°C). Când s-a utilizat celulaza nativă randamentul maxim a fost de aproximativ 80%, iar în cazul celulozei imobilizate acest randament a fost de aproximativ 50%, după 24 ore de hidroliză. Aceeași valoare a temperaturii optime (50°C) a fost observată de Jordan ș.a. în cazul hidrolizei enzimatică a celulozei microcristaline catalizată de celulaza nativă și celulaza imobilizată prin adsorbție pe nanoparticule de magnetită [61].

Odată cu creșterea temperaturii (50-70°C) diferența dintre randamentele de hidroliză pentru cele două tipuri de enzimă a scăzut. S-a observat că la 70°C randamentele obținute în urma hidrolizei celulozei microcristaline catalizate de celulaza nativă și imobilizată au fost aproape aceleași (25% când s-a folosit celulaza nativă, respectiv 22% când s-a folosit preparatul celulozic obținut prin imobilizare). Se confirmă astfel că imobilizarea celulozei prin tehnica entrapării în sol-gel determină creșterea stabilității enzimei la temperaturi mai ridicate.

II.4.3. Studiul efectului inhibitor al produsului de hidroliză

Creșterea cantității de zaharuri fermentescibile prin acțiunea enzimelor celololitice este unul din scopurile principale ale unui asemenea proces. Din nefericire, produșii principali ai reacției de hidroliză, celobioza și glucoza, pot inactiva celulaza din *Trichoderma reesei*. Pentru prevenirea fenomenului de inhibiție au fost încercate diferite procedee *in situ* de îndepărtare a glucozei [167], de exemplu prin trecerea glucozei prin membrane tubulare [168].

Deoarece produsul principal al reacției de hidroliză enzimatică a celulozei este glucoza, s-a studiat efectul concentrației de glucoză asupra activității catalitice a celulozei native și imobilizate [165]. Studiul s-a realizat prin adăugare de diferite concentrații de glucoză (1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml și 20 mg/ml) în amestecul inițial de hidroliză enzimatică a carboximetilcelulozei (2%), catalizată de 5 μ l/ml celulază nativă sau 50 mg/ml celulaza imobilizată. Preparatul enzimatic utilizat în acest studiu a fost cel obținut prin entrapare în sol-gel folosind silanii precursori MeTMOs/TMOs în raport molar 3:1. Volumul total al reacției a fost de 2 ml. Influența concentrației de glucoză asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului este prezentată în Tabelul II.33. Activitatea celulozei a fost calculată pe baza concentrației de glucoză eliberate, după 30 minute de reacție.

Tabelul II.33. Influența concentrației de glucoză asupra activității enzimatică a celulozei native și imobilizate

Glucoză introdusă (mg/ml)	Celulaza nativă		Celulaza imobilizată	
	Glucoză eliberată (mg/ml)	Activitate (μ moli \cdot min $^{-1}\cdot$ ml $^{-1}$ enzimă)	Glucoză eliberată (mg/ml)	Activitate (μ moli \cdot min $^{-1}\cdot$ g $^{-1}$ preparat)
0	1,43	52,96	6,11	22,66
1	1,21	44,81	5,68	21,04
3	1,22	45,30	5,59	20,74
5	0,93	34,44	5,68	21,04
10	0,53	19,63	3,94	14,59
15	0,48	17,84	2,47	9,18
20	0,27	10,18	1,62	6,03

Influența concentrației de glucoză asupra activităților enzimatică relative este redată în Figura II.22.

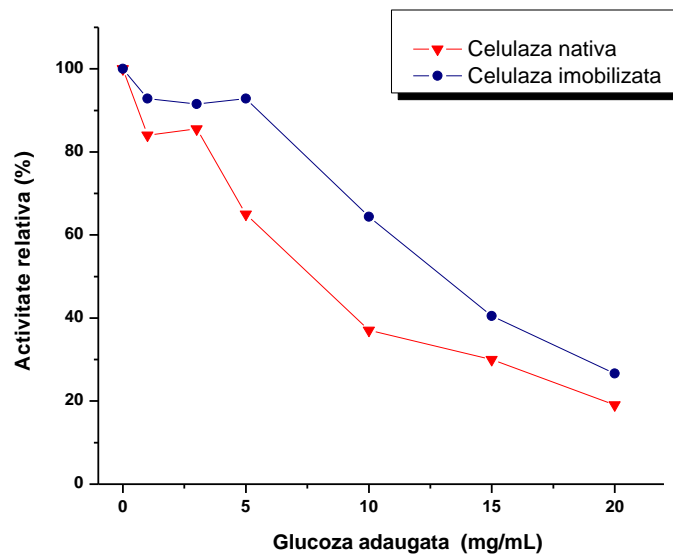


Figura II.22. Efectul concentrației de glucoză asupra eficienței catalitice a celulazei

Activitatea celulazei native s-a menținut aproximativ constantă până la o concentrație de glucoză de 3 mg/ml, în timp activitatea enzimatică celulazei imobilizate prin tehnica entrapării în sol-gel a fost aproximativ constantă până la 5 mg/ml glucoză. Odată cu creșterea concentrației de glucoză la 5 mg/ml s-a observat scăderea semnificativă a activității celulazei native la aproximativ 65% din valoarea inițială, în timp ce la această concentrație activitatea celulazei imobilizate a scăzut cu numai 7% (Figura II.22). La o concentrație de produs de 10mg/ml activitatea celulazei imobilizate a scăzut cu aproximativ 35%, comparativ cu activitatea celulazei native care la această concentrație de glucoză a scăzut cu aproximativ 60%, comparativ cu activitatea inițială. Este evident că prin creșterea cantității de glucoză eliberate în timpul reacției de hidroliză are loc inactivarea atât a celulazei native cât și celulazei imobilizată. Chang ș.a. au observat un efect similar de inhibiție de produs în timpul hidrolizei enzimatică a paielor de orez când s-a utilizat ca biocatalizator celulaza entrapată în membrane [169].

Prin urmare, entraparea celulazei în sol-gel poate fi o metodă eficientă în procesul de obținere a bioetanolului, deoarece în urma imobilizării enzimei se reduce efectul inhibitor al glucozei formate în timpul hidrolizei enzimatică a biomasei lignocelulozice. Acest lucru permite operarea pe gamă mai extinsă pentru parametrii procesului (în cazul nostru concentrația de glucoză din sistem), ceea ce este important chiar și în cazul în care obținerea bioetanolului are loc prin zaharificare și fermentare simultană. În cazul utilizării celulazei imobilizate prin entrapare în sol-gel în reacția de hidroliză a celulozei este recomandat să se lucreze cu concentrații de glucoză de până la 15 mg/ml, deoarece depășirea acestei concentrații determină scăderea semnificativă a activității catalitice a celulazei imobilizate.

II.4.4. Studiul stabilității la depozitare (non-operaționale) a celulazei

Stabilitatea la depozitare este o proprietate importantă a enzimelor, care permite evaluarea menținerii activității enzimei în timp, după ce s-a imobilizat în matrici siliconice de sol-gel.

S-au determinat activitățile în reacția de hidroliză a carboximetilcelulozei după diferite intervale de timp, respectiv 0, 5, 15, 25, 35 zile de depozitare. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul II.34.

Tabelul II.34. Stabilitatea în timp a celulazei native și imobilizate la temperatura ambiantă

Zile	Activitate celulază nativă ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ enzimă)	Activitate celulază imobilizată ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)
0	55,81	22,88
5	48,77	23,77
15	39,25	20,07
25	28,88	19,16
35	28,79	18,32

Figura II.23 prezintă stabilitatea la păstrare la temperatura camerei a celulazei native și imobilizate, pe baza activităților enzimatic relative.

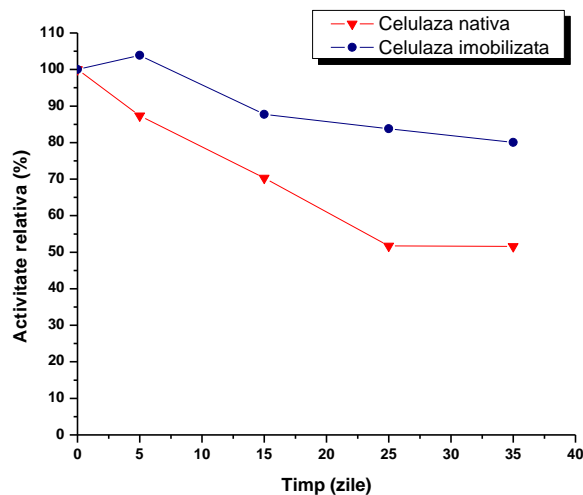


Figura II.23. Stabilitatea la păstrare la temperatura camerei a celulazei native și imobilizate

În urma imobilizării celulazei prin tehnica sol-gel s-a observat o îmbunătățire în timp a stabilității la depozitare a enzimei (Figura II.23). După o perioadă de 35 de zile de păstrare, celulaza imobilizată a pierdut aproximativ 20%, iar celulaza nativă a pierdut 50% din activitatea inițială. Takimoto ș.a. au raportat că celulaza

entrapată într-o matrice de silice mezoporoasă SBA-15 a pierdut 30% din activitatea catalitică după 4 săptămâni de menținere la temperatura camerei, în timp ce celuloza nativă a devenit complet inactivă [80].

II.4.5. Studiul stabilității celulozei în mediu apos

În reacția de hidroliză enzimatică a celulozei, operarea enzimei în soluție apoasă poate avea un rol important în inactivarea ei. Mai mult, în cazul enzimei imobilizate este posibilă și desprinderea ei din matrice și trecerea în soluție apoasă, ceea ce duce la scăderea substanțială a activității la reutilizare. Stabilitatea celulozei native și imobilizate în soluție apoasă s-a analizat prin menținerea celulozei sub agitare în soluție tampon acetat de sodiu pH 4,8 timp de 96 de ore. S-a studiat efectul timpului de menținere a celulozei în soluție apoasă asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului în reacția model de hidroliză enzimatică a 2% CMC, în tampon acetat de sodiu pH 4,8 la 50°C, utilizând 5 μl/ml celuloza nativă sau 50 mg/ml preparat celulazic (obținut prin Metoda II de entrapare cu silanii precursori MeTMOS/TMOS, în raport molar 3:1). Peste 50 mg celuloză imobilizată și 5 μl celuloză nativă s-a introdus 0,5ml tampon acetat de sodiu pH 4,8 și s-a agitat la 50°C timp de 24, 48, 72 și 96 ore. După această perioadă de incubare s-a adăugat 0,5 ml soluție 2% CMC și s-a agitat timp de 30 minute. Activitatea celulozei s-a calculat în raport cu glucoza eliberată în timpul hidrolizei substratului, după 30 minute de reacție. În Tabelul II.35 este prezentată evoluția activității celulozei native și imobilizate, după menținerea enzimelor un anumit timp în soluție apoasă, la 50°C. A fost măsurată și cantitatea de proteină din soluție, pentru a pune în evidență eventuala desprindere a enzimei din matrice.

Tabelul II.35. Evoluția în timp a activității enzimatică a celulozei native și imobilizate, în soluție apoasă, la 50°C

Timp (ore)	Celuloză nativă	Celuloză imobilizată	
	Activitate (μmoli·min ⁻¹ ·ml ⁻¹ enzimă)	Activitate (μmoli·min ⁻¹ ·g ⁻¹ preparat)	Cantitate de ^a proteină din soluție (mg)
0	50,74	19,85	-
24	46,14	18,62	0,012
48	40,69	16,88	0,022
72	35,45	15,66	0,033
96	31,47	14,09	0,028

^a 100 mg celuloză imobilizată s-a menținut în 5 ml tampon acetat de sodiu pH 4.8

Activitățile enzimatică relative calculate pe baza datelor din Tabelul II.35 s-au reprezentat Figura II.24.

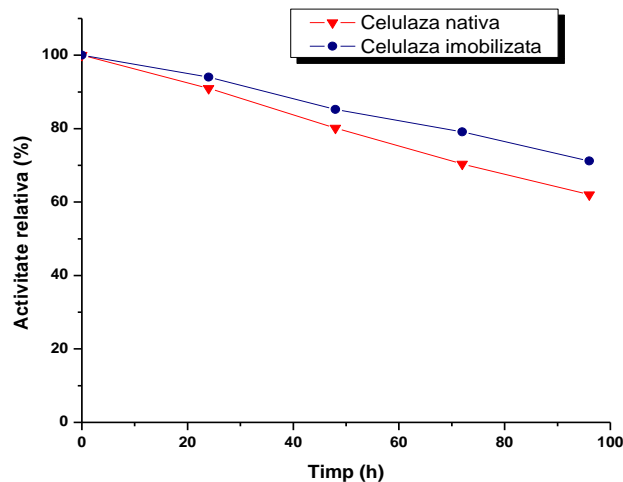


Figura II.24. Influența timpului de menținere în soluție apoasă asupra activității celulazei native și imobilizate

Se poate remarca din Figura II.24 că prin creșterea timpului de menținere în soluție apoasă scade activitatea catalitică, atât a celulazei native cât și a celei imobilizate. Totuși, prin imobilizarea celulazei, s-a înregistrat creșterea stabilității enzimei cu aproximativ 5-9%, pe tot intervalul de timp studiat. După 96 ore de agitare în soluție tampon, activitatea catalitică a celulazei imobilizate a scăzut cu aproximativ 30% din activitatea inițială, iar activitatea celulazei native a scăzut cu 40%.

Valorile cantităților de proteină din soluția tampon la diferiți timpi de agitare (Tabelul II.35) arată că nu s-a înregistrat creșterea conținutului de proteină în timpul operării, pe tot intervalul de timp studiat, prin urmare nu a avut loc desprinderea enzimei din matricea de sol-gel.

II.4.6. Influența lichidelor ionice asupra activității și stabilității celulazei

Lichidele ionice sunt o clasă de solvenți care conțin un cation organic și un anion anorganic sau organic, și au o serie de proprietăți importante printre care stabilitate termică și chimică ridicată și capacitatea lor de a dizolva unele biomacromolecule cum sunt celuloza și lignina din biomasa lignocelulozică. Deși sunt capabile să dizolve celuloza din biomasă, publicații recente au demonstrat că o serie de lichide ionice inactivează parțial sau total complexul celulazic [135, 136, 138]. Ținând cont de faptul că lichidele ionice pot avea rol important atât în procesul de pretratare a biomasei cât și ca aditiv la imobilizarea enzimei, a fost investigat modul în care este afectată activitatea enzimelor celulazice de unele lichide ionice care nu au fost încă studiate în acest sens. Un alt subiect al cercetărilor a fost măsura în care imobilizarea poate reduce efectul inactivant al lichidelor ionice asupra celulazelor.

II.4.6.1. Influența naturii lichidului ionic asupra activității catalitice a celulazei native

Pentru studiul naturii lichidului ionic asupra activității celulazei s-a studiat influența anionilor și cationilor din structura lichidului ionic. Activitatea celulazei în prezența diferitor lichide ionice a fost investigată în reacția de hidroliză enzimatică a 2% celuloză de la Macherey Nagel, catalizată de 5 $\mu\text{l/ml}$ celuloză nativă Celuclast 1.5L în 100% lichid ionic.

Determinarea activității celulazei în prezența lichidului ionic a fost descrisă la paragraful III.3.2. Tabelul II.36 prezintă efectul cationilor și anionilor din structura lichidului ionic asupra activității catalitice a celulazei.

Tabelul II.36. Influența structurii lichidului ionic asupra eficienței catalitice a celulazei Celluclast 1.5L native

Lichid Ionic		Activitate ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ enzimă)	Activitate Relativă ^a (%)
Cationi	Anioni		
[EtPy]	[Br]	25,33	47.18
[Bu4P]		19,67	36.67
[P ₁₄₍₆₆₆₎]		18,92	35.25
[Hmim]	[PF ₆]	-	-
[Bmim]		-	-
[P ₁₄₍₆₆₆₎]		-	-
[P ₁₄₍₆₆₆₎]	[Br]	18,92	35,25
	[M ₃ PPh]	11,11	20,69
	[NTf ₂]	13,69	25,51
	[PF ₆]	-	-
[Emim]	[Ac]	10,78	20,09
	[OTs]	22,55	42,01
	[TfO]	15,66	29,18
	[TOS]	14,14	26,34

^a Raportată la activitatea celulazică inițială, fără lichid ionic (53,7 U/ml enzimă)

Cationi: [EtPy]: 1-etil piridiniu, [Bu4P]: tetrabutil-fosforiu, [P₁₄₍₆₆₆₎]: trihexiltetradecil-fosforiu, [HMIM]: 1-hexil-3-metilimidazoliu, [BMIM]: 1-butil-3-metilimidazoliu, [Emim]: 1-etil-3-metilimidazoliu.

Anioni: [Br]: bromură, [PF₆]: hexafluoro-fosfat, [M₃PPh]: bis(2,4,4-trimetilpentil)fosfinate, [NTf₂]: bis(trifluorometilsulfonil)imide, [Ac]: acetat, [OTs]: toluolsulfonat, [TfO]: triflat, [TOS]: tosilat

Pentru studiul influenței cationilor asupra activității enzimatice s-a folosit același anion și diferiți cationi: [EtPy]⁺, [Bu4P]⁺, [P₁₄₍₆₆₆₎]⁺ ce conțin anionul [Br]⁻, respectiv [Hmim]⁺, [Bmim]⁺, [P₁₄₍₆₆₆₎]⁺ ce conțin anionul [PF₆]⁻. Cationul 1-etil-piridiniu a condus la obținerea unor valori mai mari ale activității catalitice comparativ cu lichidele ionice ce conțin cationul alchil-fosforiu, iar activitatea relativă a fost de aproximativ 47%.

Pentru studiul influenței anionilor asupra activității enzimatice s-a folosit același cation și anioni diferiți: [Br]⁻, [M₃PPh]⁻, [NTf₂]⁻, [PF₆]⁻ împreună cu cationul [P₁₄₍₆₆₆₎]⁺, [Ac]⁺, respectiv [OTs]⁻, [TfO]⁻, [TOS]⁻ împreună cu cationul [Emim]⁺. Enzima este mai activă în lichidele ionice ce conțin anionul bromură, comparativ cu cele care conțin anionul sulfonilimidă. S-a observat că toate lichidele ionice ce conțin anionul hexafluorofosfat inactivează complet celuloza, indiferent de cationii componenți. Activitatea catalitică a celulazei scade în ordinea următoare a anionilor:

[OTs]⁻>[TfO]⁻>[TOS]⁻>[Ac]⁻. La o concentrație de 100% [Emim]Ac, eficiența catalitică a celulozei a fost de doar 20% din activitatea inițială.

Lozano ș.a. au raportat că lichidele ionice capabile să dizolve celuloza au efect inhibitor asupra celulozei [138]. Principalul avantaj al lichidului ionic [Emim]Ac în procesul conversiei a biomasei lignocelulozice la bioetanol, îl prezintă capacitatea acestuia de a dizolva celuloza din biomasă. Însă deoarece el inactivează celuloza, [Emim]Ac nu se poate folosi ca mediu de reacție în hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă. De aceea, lichidul ionic poate fi utilizat doar pentru a dizolva celuloza din biomasă lignocelulozică, nu și ca mediu de reacție în hidroliza enzimatică a celulozei.

II.4.6.2. Influența concentrației de lichid ionic asupra activității celulozei native și imobilizate

Pentru studiul influenței lichidelor ionice asupra activității catalitice a celulozei, diferite cantități de lichid ionic au fost introduse în reacția de hidroliză enzimatică a celulozei microcristaline (Macherey Nagel). Mediul de reacție utilizat pentru hidroliza celulozei (2% în tampon acetat de sodiu 0,05M, pH 4,8) a conținut 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, respectiv 100% lichid ionic. Probele s-au încălzit la 50°C, după care s-a adăugat 5 μl/ml celuloză nativă sau 50 mg/ml celuloză imobilizată (Metoda II, silanii precursori MeTMOS:TMOS, în raport molar 3:1).

Pentru studiul influenței concentrației de lichid ionic asupra activității catalitice a celulozei native și imobilizate s-au folosit 4 lichide ionice: clorura de 1-butyl-3-metilimidazoliu ([Bmim]Cl), dimetilfosfatul de 1,3-dimetilimidazoliu ([Mmim]DMP), acetatul de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]Ac), tetrafluoroboratul de 1-butyl-3-metilimidazoliu ([Bmim]BF₄). Cantitățile de glucoză eliberate după 30 minute de hidroliză a celulozei catalizată de celuloza nativă Celluclast 1.5L, la diferite concentrații de lichid ionic sunt prezentate în Tabelul II.37.

Tabelul II.37. Cantitățile de glucoză eliberate după 30 minute în reacția de hidroliză a celulozei microcristaline, la diferite concentrații de lichid ionic

Concentrație Lichid ionic (%)	Cantitate de glucoză eliberată (mg)			
	[Bmim]Cl	[Mmim]DMP	[Emim]Ac	[Bmim]BF ₄
0	1,44	1,44	1,44	1,44
10	1,23	0,90	1,12	1,37
20	0,86	0,96	1,10	1,23
40	0,61	0,93	0,93	1,12
60	0,47	0,69	0,82	0,82
80	0,27	0,65	0,50	0,54
100	0,15	0,62	0,38	0,43

Pe baza datelor din Tabelul II.37 s-au calculat activitățile catalitice ale celulozei la diferite concentrații de lichid ionic, care s-au reprezentat Figura II.25.

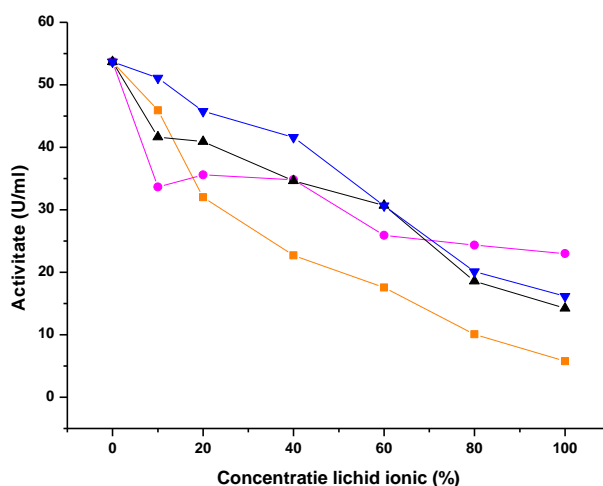


Figura II.25. Influența concentrației de lichid ionic asupra eficienței catalitice a celulazei native

[Bmim]Cl (-■-), [Mmim]DMP (-●-), [Emim]Ac (-▲-), [Bmim]BF₄ (-▼-)

Se observă că (Figura II.25) la creșterea concentrației de lichid ionic scade activitatea catalitică a celulazei native. Dintre cele patru lichide ionice testate, [Bmim]Cl a dus la obținerea celor mai mici valori ale activității celulazice. Chiar dacă, dintre lichidele ionice studiate, [Mmim]DMP a inactivat mai puțin celulaza, prin creșterea concentrației acestuia s-a redus eficiența catalitică. Astfel, chiar la o concentrație de 20% [Mmim]DMP, activitatea catalitică a scăzut cu aproximativ 34%. Engel ș.a. au raportat că la o concentrație de 10% [Mmim]DMP s-a menținut aproximativ 60% din activitatea celulazică [136]. Publicații recente au relatat că lichidele ionice [Bmim]Cl, respectiv [Emim]Ac inactivează complet celulaza [136, 138]. Deoarece în urma imobilizării celulazei prin tehnica entrapării în sol-gel stabilitatea acesteia a crescut (stabilitatea termică, stabilitatea în mediului de reacție, stabilitatea de produs, stabilitatea la depozitare și de menținere în soluție apoasă) s-a studiat stabilitatea celulazei imobilizate în mediu de lichid ionic. Pentru acest studiu s-a utilizat lichidul ionic [Emim]Ac, care solubilizează celuloza. Tabelul II.38 prezintă activitățile catalitice ale celulazei native și imobilizate calculate la diferite concentrații de [Emim]Ac.

Tabelul II.38. Influența concentrației de [Emim]Ac asupra activității enzimatică a celulazei native și imobilizate

Concentrație [EMIM][Ac] (%)	Activitate celulază nativă ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ enzimă)	Activitate celulază imobilizată ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)
0	53,7	6,27
10	41,64	3,50
20	40,92	2,22
40	34,62	1,36
60	30,7	1,48

Activitățile enzimactice relative ale celulazei native și imobilizate la diferite concentrații de [Emim]Ac sunt prezentate în Figura II.26.

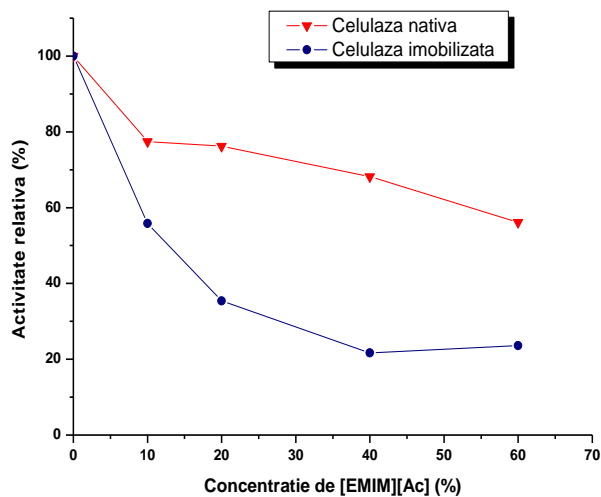


Figura II.26. Influența concentrației de [Emim]Ac asupra activității celulazei native și imobilizate

Celulaza nativă a fost mai stabilă în prezența lichidului ionic [EMIM]Ac decât celulaza imobilizată. Activitatea celulazică în 60% lichid ionic a fost de 56,5% din activitatea inițială pentru celulaza nativă, comparativ cu 23,6% pentru celulaza imobilizată. Indiferent de concentrația de [Emim]Ac, activitatea celulazei imobilizată a fost mai mică decât a celulazei native. Probabil că lichidul ionic pătrunde în matricea de sol-gel și blochează enzima, chiar la concentrații mici.

Concluzia acestui studiu este că lichidele ionice nu se pot folosi ca mediu de reacție în hidroliza enzimatică a celulozei, iar dacă se utilizează pentru dizolvarea biomasei lignocelulozice ele trebuie îndepărtate complet din celuloza regenerată sau din materialul pretratat.

II.4.7. Concluzii

- Studiile de stabilitate ale celulazei, în condițiile studiate, au demonstrat că după imobilizare, celulaza a fost mai stabilă la valori mai mari de pH (6,2-7,4), la valori mai mari de temperatură (60-80°C), la concentrații mai mari de produs (5-15 mg/ml), la depozitare, respectiv în timpul operării în soluție apoasă.
- În prezența lichidului ionic [Emim]Ac, celulaza nativă a fost mai stabilă decât enzima imobilizată, aceasta probabil datorându-se faptului că lichidul ionic pătrunde în matricea de sol-gel astfel inactivând mult mai repede enzima. Deși lichidele ionice sunt capabile să dizolve celuloza din biomasă, ele inactivează complexul celulazic, de aceea nu se pot folosi ca mediu de reacție în hidroliza enzimatică a celulozei, ci doar la pretratarea sau dizolvarea biomasei lignocelulozice.

II.5. Caracterizarea operațională a celulei imobilizate

Obiectivul cercetărilor prezentate în acest capitol a fost caracterizarea performanțelor operaționale ale celulei imobilizate, ținând cont de faptul că acest biocatalizator a fost obținut pentru reacția de hidroliză a celulozei din biomasa lignocelulozică. În acest scop, au fost investigate hidroliza celulozei din rumeguș de plop pretratată (așa cum a fost prezentat în capitolul II.2.4), comparativ cu celuloza microcristalină standard, au fost determinați anumiți parametri cinetici și s-a studiat reutilizarea celulei imobilizate în mai multe cicluri de hidroliză. Toate aceste experimente au fost realizate și cu celulază nativă, pentru a se putea diferenția efectul imobilizării asupra parametrilor studiați.

II.5.1. Hidroliza enzimatică a celulozei utilizând celuloza imobilizată prin metoda sol-gel

5 mg/ml celuloză microcristalină Avicel PH101 și celuloză regenerată după dizolvarea plopului pretratată cu acid diluat și biomasei standard în soluția de DMSO/[Emim]Ac a fost supusă hidrolizei enzimatică la 50°C cu 5 μl/ml celulază nativă (0,62 mg proteină/ml) sau 10 mg/ml celulază imobilizată (0,44 mg proteină/ml). S-a folosit celuloza imobilizată prin Metoda II de entrapare în sol-gel cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1, acesta fiind cel mai eficient preparat obținut. Evoluția reacției de hidroliză a fost urmărită în timp, prin prelevare de probe la intervale stabilite, cantitatea de zaharuri totale (exprimate ca glucoză echivalentă), determinându-se prin metoda spectrofotometrică cu acid 3,5-dinitrosalicilic. Tabelul II.39 și Tabelul II.40 prezintă randamentele de hidroliză și cantitățile totale de zaharuri eliberate la diferite momente ale reacției de hidroliză [162].

Tabelul II.39. Hidroliza enzimatică a celulozei standard Avicel PH101 și a celulozei regenerată din soluția de DMSO/[Emim]Ac, catalizată de celulaza nativă

Timp (ore)	Concentrație de zaharuri eliberate (mg/ml)		
	Celuloză microcristalină Avicel	Celuloză regenerată	
		Standard (Avicel)	Plop pretratată
2	1,76	2,78	1,22
4	2,46	4,09	1,81
6	3,43	4,91	2,91
8	4,09	5,64	3,53
24	5,52	5,71	4,40

Tabelul II.40. Hidroliza enzimatică a celulozei standard Avicel PH101 și a celulozei regenerate din soluția de DMSO/[Emim]Ac, catalizată de celulaza imobilizată

Timp (ore)	Concentrație de zaharuri eliberate (mg/ml)		
	Celuloză microcristalină Avicel	Celuloză regenerată	
		Standard (Avicel)	Plop pretratat
2	1,02	2,24	0,91
4	1,62	3,78	1,57
6	2,12	4,39	1,80
8	2,76	4,98	2,39
24	3,98	5,40	3,29

Figura II.27 prezintă evoluția în timp a randamentului hidrolizei enzimatică a celulozei, catalizată de celulaza nativă și imobilizată.

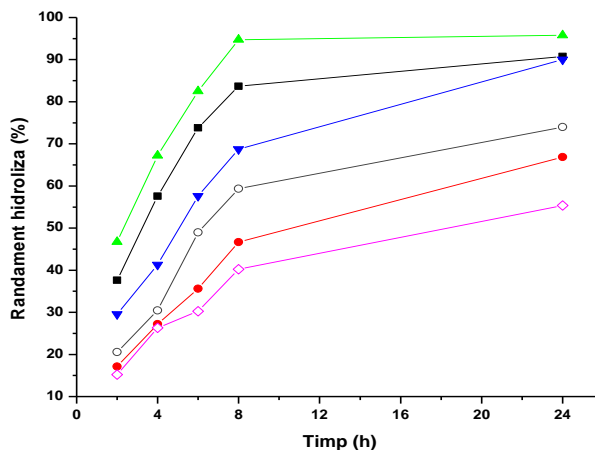


Figura II.27. Evoluția în timp a hidrolizei enzimatică a 5 mg/ml celuloză catalizate de celulaza nativă și imobilizată

- ▲- Hidroliza celulozei Avicel regenerată cu celulaza nativă;
- Hidroliza celulozei Avicel regenerată cu celulaza imobilizată;
- ▼- Hidroliza celulozei Avicel cu celulaza nativă;
- Hidroliza celulozei Avicel cu celulaza imobilizată;
- Hidroliza celulozei din plop cu celulaza nativă;
- ◇- Hidroliza celulozei din plop cu celulaza imobilizată;

Cantitatea totală de zaharuri crește, indiferent de substratul și enzima folosite în hidroliza enzimatică, pe tot intervalul de timp studiat. După pretratarea celulozei microcristaline Avicel PH101 cu soluția de DMSO/[Emim]Ac, randamentul de hidroliză al celulozei regenerate catalizată atât de celulaza nativă, cât și de celulaza imobilizată, a crescut semnificativ, comparativ cu randamentul de hidroliză al celulozei Avicel microcristaline (Figura II.27). Aceasta se datorează faptului că celuloza regenerată din soluția de DMSO/[Emim]Ac prezintă un grad de cristalinitate mai scăzut decât celuloza microcristalină ceea ce a permis ca accesul enzimelor la substrat să fie îmbunătățit. Utilizând celulaza nativă, randamentul de hidroliză

calculat după 8 ore de reacție în urma hidrolizei enzimaticice a celulozei regenerare, a fost aproximativ 95%, comparativ cu randamentul de hidroliză de aproximativ 69% obținut în urma hidrolizei celulozei Avicel microcristaline. Când reacția a fost catalizată de celuloza imobilizată, randamentul de reacție calculat după 8 ore în urma hidrolizei celulozei regenerare, a fost de aproximativ 84%, respectiv 46% în urma hidrolizei enzimaticice a celulozei Avicel microcristaline.

Dacă s-a folosit ca substrat celuloza microcristalină ca atare sau regenerată, randamentele de hidroliză calculate au fost mai mici pe tot parcursul reacției pentru reacția catalizată de celuloza imobilizată, comparativ cu celuloza nativă. De exemplu, când reacția a fost catalizată de celuloza imobilizată, randamentul de hidroliză a celulozei microcristaline regenerată după 24 ore a fost de aproximativ 84%, iar când reacția a fost catalizată de celuloza nativă a fost de 95%. Acest lucru se poate explica prin limitările difuzionale care apar după imobilizare, cât și prin utilizarea cu aproximativ 40% mai multă enzimă nativă (0,62 mg proteină/ml), comparativ cu cantitatea de enzimă din preparatul celulozic imobilizat (0,44 mg proteină/ml). Chiar dacă performanțele operaționale nu au fost cele așteptate, celuloza imobilizată prezintă o serie de alte avantaje importante cum ar fi stabilitate ridicată și posibilitatea de reutilizare.

Celuloza din plop obținută în urma dizolvării biomasei în DMSO/[Emim]Ac și reprecipitate a fost de asemenea hidrolizată cu randamente bune în prezența celulozei native și imobilizate, iar cantitatea de zaharuri eliberată în urma hidrolizei a crescut pe tot intervalul de timp studiat (Figura II.27). După 24 ore de reacție, randamentul de hidroliză a fost de aproximativ 70% cu celuloza nativă, respectiv 50% cu cea imobilizată.

Cantitatea de glucoză eliberată în urma hidrolizei enzimaticice a celulozei regenerare (din biomasa standard și din plop) și celulozei microcristaline Avicel s-a analizat și prin cromatografia de lichide, pentru a face o verificare a metodei chimice de analiză care a fost utilizată în experimentele anterioare. Metoda cantitativă de analiză a cantității de zaharuri prin cromatografia de lichide a fost prezentată la punctul III.3.4. Cromatogramele probelor de zaharuri eliberate după 24 ore de hidroliză enzimatică a celulozei Avicel regenerare, celulozei microcristaline Avicel, respectiv celulozei din plop catalizată de celuloza nativă și celuloza imobilizată sunt prezentate în Anexa. Cantitatea de glucoză eliberată în urma hidrolizei enzimaticice a celulozei, la 24 ore de reacție este prezentată în Tabelul II.41. Aceste rezultate sunt conforme cu cele obținute prin metoda cu acid 3,5-dinitrosalicilic, valorile fiind mai mici datorită faptului că s-a determinat numai glucoza, în timp ce prin metoda chimică a fost determinată cantitatea totală de zaharuri reducătoare din sistemul de reacție.

Tabelul II.41. Determinarea cantității de glucoză eliberate prin metoda cromatografică de analiză a zaharurilor

Biocatalizator	Cantitate de glucoză (mg/ml)		
	Celuloză Avicel regenerată	Celuloză Avicel	Celuloza din plop
Celuloza nativă	4,49	5,01	3,93
Celuloza imobilizată	4,86	2,96	2,56

II.5.2. Studiul cinetic al hidrolizei enzimatică a celulozei microcristaline catalizată de celuloza nativă și imobilizată

Studiul cineticii enzimatică se bazează, ca și cinetica chimică, pe măsurarea vitezei de reacție în condiții standard. Pentru a stabili efectele entrapării celulozei în matrici de sol-gel asupra accesului substratului în situsul catalitic și implicit a vitezei de formare a produsului s-a studiat cinetica reacției de hidroliză enzimatică a Avicel PH101 utilizând celuloza nativă și celuloza imobilizată. Cinetica reacției de hidroliză enzimatică a celulozei catalizată de celuloza nativă și imobilizată este complexă. Aceasta se datorează faptului că reacția este eterogenă și prezintă o serie de limitări, printre care scăderea vitezei de reacție odată cu creșterea conversiei [170]. Acest model a fost elaborat pentru cinetica reacțiilor omogene, însă se poate aplica și în hidroliza celulozei insolubile, așa cum au demonstrat Bezerra și Dias pentru reacția de hidroliză a celulozei Avicel [171].

Studiul cinetic s-a realizat prin modificarea concentrației de substrat de la 16,65 la 333,04 mM în tampon acetat de sodiu pH 4.8, 5 μl/ml celuloză nativă (0,62 mg proteină/ml) și 10 mg/ml celuloza imobilizată (0,44 mg proteină/ml) și temperatura de 50°C. Preparatul celulozic s-a imobilizat prin metoda II entrapare în sol-gel utilizând silanii precursori MeTMOS:TMOS în raport molar 3:1. Volumul total al reacției s-a menținut la 10 ml. Masa moleculară a celulozei microcristaline s-a exprimat ca o unitate de glucoză anhidră. S-au prelevat probe la 2, 4, 6, 8 ore de reacție, iar cantitatea de zahăr eliberat în urma reacției s-a determinat prin metoda cu acid 3,5-dinitrosalicilic. Tabelul II.42 prezintă vitezele inițiale de reacție la fiecare concentrație de substrat. Vitezele inițiale au fost determinate pe baza cantității de produs eliberate la intervalele de timp studiate și s-a exprimat în mmol/h.

Tabelul II.42. Vitezele inițiale de reacție pentru hidroliza celulozei catalizată de celuloza nativă și imobilizată, la diferite concentrații de substrat

Concentrație Substrat (mM)	Viteză inițială (mmol/h)	
	Celuloza nativă	Celuloza imobilizată
16,65	2,006	1,103
27,75	3,090	1,557
55,51	6,589	2,497
83,26	6,507	3,026
110,01	8,187	3,935
138,78	9,811	4,451
166,52	10,307	4,404
222,02	13,331	3,952
277,53	12,361	4,444
333,04	12,942	4,459

Pentru determinarea parametrilor cinetici s-a utilizat modelul clasic Michaelis-Menten. Același model a fost utilizat și de Balsan ș.a. pentru a determina efectul substratului asupra activității celulozei din *Trichoderma reesei* [172]. Parametrii cinetici ai reacției de hidroliză enzimatică au fost calculați cu ajutorul programului Sigma Plot (Systat Software Inc.)

Pe baza datelor din Tabelul II.42 s-a realizat Figura II.28 care reprezintă curba de cinetică Michaelis-Menten în cazul substratului Avicel PH101.

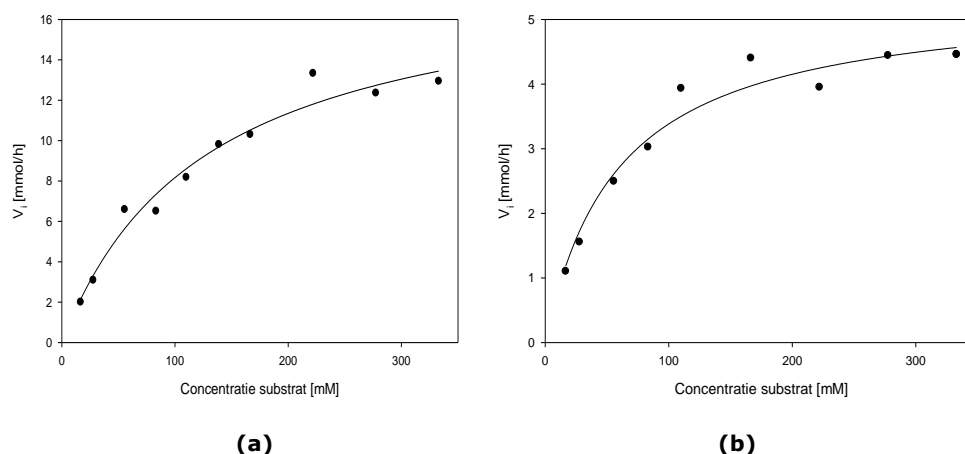


Figura II.28. Curba de cinetică Michaelis-Menten pentru determinarea parametrilor cinetici în reacția de hidroliză a celulozei Avicel PH101 catalizată de a. celuloza nativă; b. celuloza imobilizată

Valorile constantei Michaelis-Menten (K_m) și vitezei maxime (v_{max}) au fost obținute cu ajutorul programului Sigma-Plot și au fost utilizate pentru calculul constantelor catalitice $k_{cat} = v_{max}/E$ (E este concentrația de enzimă exprimată în mM) și a eficienței catalitice (k_{cat}/K_m). Pentru a face posibilă calcularea constantei catalitice k_{cat} și pentru a putea compara eficiențele catalitice ale celulozei native și imobilizate s-a estimat o masă moleculară medie a celulozei ca fiind 42.000 g/mol, conform datelor raportate pentru endoglucanaza din *Trichoderma viride* [173]. S-a presupus că endoglucanaza reprezintă componenta majoritară din complexului celulozic Celluclast 1.5L.

Valorile constantei Michaelis-Menten, vitezei maxime și eficienței catalitice pentru celuloza nativă și imobilizată sunt prezentate în Tabelul II.43.

Tabelul II.43. Cinetica reacției de hidroliză catalizată de celuloza nativă și imobilizată

Enzimă	Parametrii cinetici		
	K_m (mM)	v_{max} (mM/h)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ h ⁻¹)
Celuloza nativă	127,6±25,7	18,6±1,6	9,9
Celuloza imobilizată	58,8±10,0	5,37±0,2	8,8

Entraparea celulozei în matrici siliconice a determinat o scădere a constantei Michaelis-Menten (K_m) de la 127,6±25.7 mM la 58,8±10,0 mM. În același timp, viteza maximă a scăzut de 3,46 ori după imobilizare (de la 18,6 mM h⁻¹ la 5,4 mM h⁻¹). O comportare similară a parametrilor cinetici a fost observată și de Yu ș.a. în reacția de hidroliză enzimatică a carboximetilcelulozei (CMC) catalizată de celuloza imobilizată prin legare covalentă de Eudragit S-100 [174]. Scăderea valorii constantei Michaelis-Menten (K_m) a fost corelată cu o afinitate mai ridicată a celulozei imobilizate pentru celuloza Avicel. Scăderea vitezei maxime se poate explica prin creșterea rezistenței la transferul de masă după imobilizare, datorată în special masei moleculare mari a substratului.

Eficiența catalitică totală a reacției catalizată enzimatic pentru celuloza imobilizată, exprimată prin raportul k_{cat}/Km , a fost de $8.8 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, observându-se o mică scădere a eficienței catalitice, comparativ cu celuloza nativă pentru care k_{cat}/Km a fost de $9.9 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$. Aceasta se datorează creșterii rezistenței la transferul de masă în urma fenomenului de difuzie îngreunată, frecvent întâlnit după imobilizarea enzimelor.

II.5.3. Creșterea eficienței procesului de hidroliză enzimatică prin reutilizarea celulozei imobilizate prin entrapare în sol-gel

Reutilizarea celulozei în mai multe cicluri de reacție, utilizând ca substrat celuloza microcristalină, reprezintă unul dintre principalele obiective ale acestei lucrări. Acest aspect este esențial mai ales pentru creșterea cantității de zaharuri fermentescibile și diminuarea costurilor procesului. În general se consideră că enzima poate fi reutilizată până când activitatea sa scade la mai puțin de 25% din cea inițială. Preparatul celulazic obținut în urma imobilizării prin metoda II de entrapare în matrici siliconice utilizând silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1, a fost reutilizat folosind ca substrat celuloza standard Avicel PH101 (netratată) [165] și celuloza Avicel PH101 regenerată din soluția de DMSO/[Emim]Ac (pretrată) [162].

Metoda de dizolvarea a celulozei Avicel PH101 în soluția de DMSO/[Emim]Ac a fost prezentată la punctul III.2.4. După fiecare utilizare, preparatul celulazic a fost recuperat prin decantare, spălat de mai multe ori cu soluție tampon acetat de sodiu pH 4,8, după care s-a adăugat cantitatea de celuloză până la 5 mg/ml. Cantitățile de zahar și activitățile celulozei imobilizate calculate pentru ambele substraturi folosite la reutilizare sunt prezentate în Tabelul II.44 și Tabelul II.45.

Tabelul II.44. Reutilizarea celulozei imobilizată prin metoda entrapării în sol-gel în reacția de hidroliză a celulozei microcristaline Avicel PH101 (netratată)

Număr ciclu de reacție	Concentrație Glucoză (mg/ml)	Activitate ^a ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)
0	4,26	1,64
1	2,68	1,03
2	2,37	0,91
3	1,81	0,70
4	1,46	0,56
5	1,09	0,42
6	0,56	0,22

^a Calculată la 24 ore de reacție

Tabelul II.45. Reutilizarea celulozei imobilizată prin metoda entrapării în sol-gel în reacția de hidroliză a celulozei Avicel PH101 regenerată din DMSO/[Emim]Ac (pretrată)

Număr cicluri de reacție	Concentrație Glucoză (mg/ml)	Activitate ^a ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat)
0	4,98	5,76
1	3,71	4,29
2	3,12	3,61
3	2,45	2,83
4	2,57	2,97
5	2,09	2,17
6	1,88	2,17
7	1,34	1,55
8	1,21	1,40
9	0,95	1,09

^a Calculată la 8 ore de reacție

Pe baza datelor din Tabelul II.44 și Tabelul II.45 s-au calculat activitățile enzimactice relative s-a realizat Figura II.29 care reprezintă influența numărului de cicluri de reacție asupra activității relative a celulozei imobilizate.

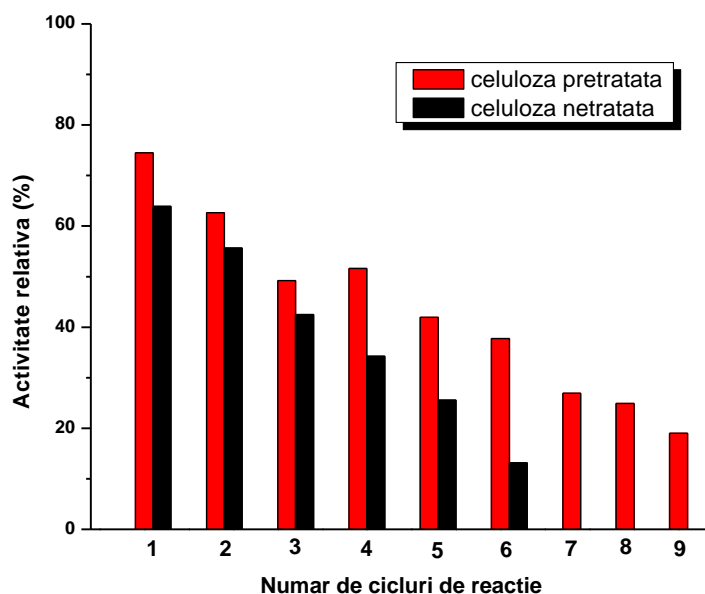


Figura II.29. Influența numărului de cicluri de reacție asupra activității relative a celulozei imobilizate în reacția de hidroliză a celulozei netratate (după 24 de ore de reacție), respectiv pretratate (după 8 ore de reacție)

Se observă că celuloza imobilizată are o capacitate mai bună de a hidroliza celuloza Avicel PH101 regenerată din DMSO/[Emim]Ac (pretrată), deoarece după dizolvarea celulozei în soluția de dimetilsulfoxid/lichid ionic, celuloza regenerată

prezintă un grad de cristalinitate mai scăzut (caracterizarea celulozei regenerare s-a prezentat la punctul II.2.4.1.), de aceea accesul celulozei la substrat a fost îmbunătățit. De menționat este faptul că, deși activitatea celulozei imobilizate, utilizând ca substrat celuloza pretratată a fost calculată după 8 ore de hidroliză, iar activitatea celulozei imobilizate utilizând ca substrat celuloza netratată a fost calculată la 24 ore de hidroliză (pentru aceeași cantitate de celuloză și enzimă folosită în reacție), celuloza imobilizată a avut activitate mai mare pe substrat de celuloză pretratată.

Activitatea celulozei imobilizate (calculată după 8 ore), la primul ciclu de reutilizare, pe substrat de celuloză pretratată a fost de aproximativ 74% din activitatea inițială, iar când s-a utilizat ca substrat celuloza Avicel netratată, activitatea (calculată la 24 ore) a fost de 63% din activitatea inițială.

Celuloza imobilizată a putut fi reutilizată de nouă ori atunci când s-a folosit ca substrat celuloza pretratată, respectiv de șase ori atunci când s-a folosit ca substrat celuloza netratată. Pentru ambele substraturi folosite la reutilizare, activitatea celulozei imobilizate scade după fiecare ciclu, aceasta datorându-se scăderii în timp a stabilității în soluție apoasă (studiul stabilității operaționale a celulozei imobilizate s-a prezentat la punctul II.4.5).

După a cincea reutilizare, activitatea catalitică a celulozei imobilizate, testat pe substrat de celuloză netratată a scăzut la 40% din activitatea inițială. La ciclul 6 de utilizare a preparatului, activitatea catalitică calculată atunci când s-a folosit ca substrat celuloza pretratată a fost de aproximativ 37% din activitatea inițială, iar când s-a folosit celuloza netratată a fost de 13%. La ciclul 9 de utilizare, activitatea preparatului celulozic testat pe substrat de celuloză pretratată a fost de aproximativ 19% din activitatea inițială. Dințer ș.a. au observat că activitatea celulozei din *Aspergillus niger* imobilizată polivinilalcool (PVA) a scăzut la 36% din activitatea inițială, după șase cicluri de reutilizare pe carboximetilceluloză [67]. Li ș.a. au raportat că activitatea celulozei imobilizate pe membrane lipozomiale a scăzut cu 50% după cinci reutilizări pe celuloză insolubilă CC31 [66].

Se preferă ca celuloza imobilizată să se reutilizeze pe substrat de celuloză pretratată cu DMSO/[Emim]Ac deoarece se cunosc o serie de avantaje: celuloza pretratată prezintă un grad de cristalinitate mai scăzut, astfel se îmbunătățește accesul enzimei la substrat, crește numărul de reutilizări ale preparatului celulozic și cantitatea de zaharuri fermentescibile, se reduce timpul de hidroliză, respectiv deoarece soluția de DMSO/[Emim]Ac se poate reutiliza ușor, celuloza a fost pretratată cu DMSO/[Emim]Ac recuperată, prin urmare scad costurile economice.

II.5.4. Concluzii

- Dizolvarea celulozei Avicel în soluția de DMSO/[Emim]Ac și regenerarea ei a fost benefică pentru reacția de hidroliză enzimatică a celulozei catalizată, atât de celuloza nativă cât și de celuloza imobilizată, deoarece a determinat creșterea cantității de zaharuri fermentescibile. Celuloza regenerată prezintă un grad de cristalinitate mai mic decât celuloza microcristalină, astfel accesul celulozei la substrat a fost îmbunătățit.

- Randamentele de hidroliză calculate pe tot parcursul reacției, au fost mai mici pentru reacția catalizată de celuloza imobilizată (50% după 24 ore de reacție), comparativ cu celuloza nativă (85% după 24 ore de reacție). Acest lucru se poate justifica prin faptul că după imobilizare apare fenomenul de difuzie îngreunată, cât și datorită faptului că preparatul celulozic introdus la hidroliză conține o cantitate mai mică de proteină decât celuloza nativă.

- Deși cantitatea de proteină din preparatul celulozic a fost cu 40% mai mică decât din celuloza nativă, dizolvarea celulozei în DMSO/[Emim]Ac și regenerarea ei a determinat îmbunătățirea randamentului de hidroliză a celulozei catalizată de celuloza imobilizată, diferențele între randamentele obținute cu cele două enzime, nativă și imobilizată, fiind de aproximativ 10%.
- Celuloza imobilizată a fost capabilă să hidrolizeze celuloza din plop. Cantitatea de zaharuri eliberată în urma hidrolizei celulozei din plop a crescut pe tot intervalul de timp studiat, în cazul ambilor biocatalizatori utilizați în reacție. După 24 ore de reacție, randamentul de hidroliză obținut în urma hidrolizei celulozei din plop catalizată de celuloza nativă a fost de 70%, iar când s-a folosit celuloza imobilizată a fost de aproximativ 50%.
- Studiile cinetice efectuate au arătat că entraparea celulozei în matrici siliconice a determinat o scădere a constantei Michaelis-Menten (K_m), ceea ce dovedește o afinitate mai ridicată a celulozei imobilizate pentru celuloza Avicel. Creșterea rezistenței la transferul de masă datorat fenomenului de difuzie îngreunată apărut după imobilizare a determinat scăderea vitezei maxime și eficienței catalitice totale a celulozei imobilizate.
- Celuloza imobilizată a fost reutilizată de nouă ori atunci când s-a folosit ca substrat celuloza Avicel regenerată, respectiv de șase ori atunci când s-a folosit ca substrat celuloza microcristalină Avicel, însă activitatea preparatului a scăzut după fiecare ciclu, aceasta datorându-se scăderii în timp a stabilității enzimei în soluție apoasă. Activitatea celulozei imobilizate a fost mai mare, când reutilizarea s-a făcut pe substrat de celuloză regenerată, decât în cazul în care reutilizarea s-a realizat pe celuloză microcristalină. La a cincea reutilizare pe celuloză Avicel microcristalină, respectiv la a opta reutilizare pe celuloză regenerată, celuloza imobilizată a pierdut aproximativ 70% din activitatea inițială.
- Reutilizarea celulozei imobilizate pe substrat de celuloză regenerată, după dizolvare în DMSO/[Emim]Ac prezintă o serie de avantaje: celuloza regenerată prezintă un grad de cristalinitate mai scăzut, astfel se îmbunătățește accesul enzimei la substrat, crește numărul de reutilizări ale preparatului celulozic, crește cantitatea de zaharuri fermentescibile, se reduce timpul de hidroliză, soluția de DMSO/[Emim]Ac se poate reutiliza ușor, celuloza este pretrată cu soluția de DMSO/[Emim]Ac recuperată, prin urmare scad costurile economice.

III. PARTEA EXPERIMENTALĂ

III.1. Materiale și echipamente de laborator

Materiale

Pentru realizarea studiilor s-au utilizat următorii reactivi: lemn de plop, stejar, salcâm, brad măcinate și uscate, celuloză microcristalină (Macherey Nagel), carboximetilcelulază CMC (Fluka), celuloză Avicel PH101 (Fluka), lignină Kraft (Sigma-Aldrich), acid acetic glacial (Chimactiv S.R.L București), NaOH (Chemapol), fenol (Fluka), sulfat de sodiu (Fluka), acid 3,5-dinitrosalicilic DNS (Merck), glucoză (Merck), acetonitril (Promochem), dimetilsulfoxid DMSO (Merck), acid sulfuric (Sigma-Aldrich), carbonat de calciu (Loba Feinchemie), glicerină (Merck), reactiv Folin-Ciocalteu (Merck), albumină serică BSA (Sigma-Aldrich), sulfat de cupru (Reactivul București), carbonat de sodiu (Reactivul București), tartrat dublu de sodiu și potasiu (Merck), celulaza Celluclast 1,5 L CCN 03116 (Novozyme), tetrametoxisilan TMOS 98% (Merck), feniltrimetoxisilan 99% (Fluka), metiltrimetoxisilan MeTMOS 98% (Merck), N-2-AET-3APrTMOS (Merck), 3APrTMOS (Sigma-Aldrich), etanol (Merck), acid clorhidric (Merck), fluorură de sodiu NaF (Sigma-Aldrich), 2-propanol (Merck), hexan (Merck), surfactantul TWEEN 80 (Spektrum-3D, Ungaria), polietilenglicol PEG 2000 (Fluka), 5(6)- izotiocianat de fluoresceină (Fluka), N,N-dimetilformamidă (Sigma-Aldrich), tampon fosfat de potasiu 0,1 M, pH 7,8.

Lichidele ionice dimetil-fosfat de 1,3-dimetilimidazoliu ([Mmim]DMP), clorură de 1-butil-3 metilimidazoliu ([Bmim]Cl), tetrafluoroborat de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]BF₄) și trifluoroacetat de 1-etil-3-metilimidazolui ([Emim]TFA) au fost achiziționate de la Merck. Lichidele ionice bromură de trihexiltetradecil-fosforium ([P₁₄₍₆₆₆₎]Br), bis(trifluorometilsulfonil)imide de trihexiltetradecil-fosforium ([P₁₄₍₆₆₆₎][NTf₂]), bis(2,4,4-trimetilpentil)fosfinate de trihexiltetradecil-fosforium ([P₁₄₍₆₆₆₎][M₃PPh]), hexafluoro-fosfat de trihexiltetradecil-fosforium ([P₁₄₍₆₆₆₎]PF₆), triflat de 1-etil-3-metilimidazolium ([Emim][TfO]), toluen-sulfonat de 1-etil-3-metilimidazolium ([Emim][OTs]), tosilat de 1-etil-3-metilimidazolium ([Emim][TOS]), bromură de tetrabutil-fosforium ([Bu₄P]Br), bromură de 1-etil piridium ([EtPy]Br), hexafluoro-fosfat de 1-butil-3-metilimidazolium ([Bmim]PF₆), hexafluoro-fosfat de 1-hexil-3-metilimidazolium ([Hmim]PF₆) au fost obținute de la IoLiTec. Lichidul ionic acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu a fost un cadou primit de la BASF.

Echipamente de laborator

Pentru realizarea experimentelor s-au folosit următoarele echipamente: plite electrice termostatate (SCHOTT Instruments, Germania), aparat de titrate (SCHOTT Instruments, Germania), centrifugă Boeco U-320R (Germania), tub de centrifugare cu filtru Centricon PL-30, spectofotometru UV-VIS Jasco-V-530 (Japonia), rotavapor Heidolph Laborota 4000 eficient, cromatograf de lichide HPLC (Jasco), spectofotometru FT-IT Prestige 21 (Shimatzu, Japonia), microscop cu fluorescență Leika True Confocal Scanner (Leika TCS SPE).

III.2. Rețete de lucru

III.2.1. Metode de imobilizare a celulazei

Metoda I de imobilizare prin entrapare în sol-gel

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 0,2 ml celulază, 0,8 ml tampon acetat de sodiu 0,05 M, pH = 4,8, 200 μ l lichid ionic [Emim]BF₄, TWEEN 80, respectiv PEG M = 20000 (4%), 100 μ l soluție florură de sodiu 1 M și 200 μ l alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 1 minut pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli) la diferite rapoarte molare cu menținerea agitării până la gelifiere. Gelul obținut a fost păstrat în frigider timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 5 ml tampon acetat de sodiu 0,05 M, pH = 4,8, 7 ml alcool izopropilic, 5 ml tampon acetat de sodiu, 5 ml alcool izopropilic și 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore și la etuva de vid timp de 24 ore. Această metodă este o variantă modificată a metodei aplicate de Zacula ș.a. [175]. Tabelul III.1 prezintă condițiile de imobilizare și cantitățile de preparat obținute.

Tabelul III.1. Condiții de imobilizare a preparatelor cu celulază Celluclast 1,5 L CCN 03116 obținute prin metoda I.

Condiții de imobilizare		Cantitate de preparat obținut (mg)
Silani precursori	Catalizator, aditiv	
MeTMOS:TMOS= 1:1	NaF, [Emim]BF ₄	491,48
PhTMOS:TMOS= 1:1	NaF, [Emim]BF ₄	590,21
PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, [Emim]BF ₄	556,16
MeTMOS:TMOS= 1:1	NaF, PEG	592,51
PhTMOS:TMOS= 1:1	NaF, PEG	555,27
PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, PEG	486,82
MeTMOS:TMOS= 1:1	NaF,TWEEN 80	566,96
PhTMOS:TMOS= 1:1	NaF,TWEEN 80	566,83
PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF,TWEEN 80	578,81

Metoda II de imobilizare prin entrapare în sol-gel

Intr-o fiolă de sticlă de 4 ml s-a preparat un SOL prepolimer prin amestecarea timp de o oră pe un agitator magnetic a 6 mmoli precursorii silanici în diferite rapoarte molare, 0,2 ml apă distilată, 0,5 ml alcool etilic, 30 μ l acid clorhidric 0,04 M. Peste solul apos obținut s-a mai introdus sub agitare soluția de 0,05-0,6 ml Celluclast 1,5 L/ ml tampon acetat de sodiu 0,05 M, pH = 4,8 și 50 μ l soluție florură de sodiu 1 M, continuând agitarea până când amestecul a gelifiat.

Gelul obținut a fost păstrat în frigider timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 5 ml tampon acetat de sodiu 0,05 M, pH = 4,8, 7 ml alcool izopropilic, 5 ml tampon acetat de sodiu, 5 ml alcool izopropilic și 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore și la etuva de vid timp de 24 ore. Această metodă este o variantă modificată a metodei aplicate de Kawakami ș.a. [176]. Tabelul III.2 prezintă condițiile de imobilizare și cantitățile de preparat obținute.

Tabelul III.2. Condiții de imobilizare a preparatelor cu celulază Celluclast 1,5 L CCN 03116 obținute prin metoda II

Condiții de imobilizare			Cantitate de preparat obținut (mg)
Cantitate de celulază introdusă (ml)	Silani precursori	Catalizator , aditiv	
0,2	TMOS	HCl EtOH NaF	490,1
0,2	MeTMOS:TMOS= 1:1		491,87
0,2	MeTMOS:TMOS= 2:1		540,09
0,05	MeTMOS:TMOS= 3:1		510,32
0,1	MeTMOS:TMOS= 3:1		523,09
0,2	MeTMOS:TMOS= 3:1		520,25
0,3	MeTMOS:TMOS= 3:1		500,05
0,4	MeTMOS:TMOS= 3:1		517,03
0,5	MeTMOS:TMOS= 3:1		501,34
0,6	MeTMOS:TMOS= 3:1		520,57
0,2	MeTMOS:TMOS= 4:1		538,09
0,2	MeTMOS:TMOS= 5:1		560,21
0,2	N-2-AET-3APrTMOS:TMOS=1:1		520,01
0,2	N-2-AET-3APrTMOS:TMOS=2:1		500,32
0,2	3APrTMOS:TMOS=1:1		498,43
0,2	3APrTMOS:TMOS=2:1		501,04
0,2	3APrTMOS:MeTMOS=1:1		487,98
0,2	3APrTMOS:MeTMOS=2:1		498,21

III.2.2. Metode de pretratare a biomasei lignocelulozice

III.2.2.1. Pretratamentul biomasei lignocelulozice cu acid sulfuric diluat

Într-un flacon s-au adăugat 100 mg/ml rumeguș și H₂SO₄ 0,82%, s-a închis ermetic și s-a introdus timp de 30 minute într-o încălțată termostată la 150°C. Proba s-a filtrat iar rumegușul pretratată s-a spălat cu apă distilată, după care s-a uscat timp de 6 ore la 80°C. Conținutul total de zahăr din filtratul obținut după pretratament s-a determinat prin metoda spectofotometrică cu DNS după ce s-a neutralizat acidul cu CaCO₃ până la pH=5 sau 6. Această metodă este o variantă modificată a metodei aplicate de Bower ș.a. [177]. Tabelul III.3 prezintă cantitățile de rumeguș obținute după pretratamentul acid.

Tabelul III.3. Cantitățile de biomasă pretratată cu acid sulfuric diluat

Tip Biomasă ^a	Biomasă pretratată (mg)
BRAD	211,62
SALCÂM	215,22
STEJAR	249,21
PLOP	241,91

^a cantitatea de rumeguș introdusă a fost de 300 mg

III.2.2.2. Pretratarea biomasei lignocelulozice cu glicerină

În flacoane de 5 ml închise etanș s-a introdus 100 mg rumeguș măcinat și uscat peste care se adaugă 2 ml de glicerină pură sau reziduală. Glicerina reziduală este produsul rezultat de la fabricarea biodiselului în laborator, în urma reacției dintre ulei de floarea soarelui, metanol și 0,5 % catalizator hidroxid de sodiu [158]. Probele se agită timp de 24 de ore la temperatura de 130°C. După răcire probele se centrifughează timp de 5 minute la 6.000 rpm, iar din supernatant se ia 0,1 g pentru determinarea cantității de lignină dizolvată în glicerină. Amestecul s-a încălzit la 50°C după care s-a adăugat 4 ml apă distilată și se agită în continuare timp de 3 ore. În continuare probele s-au filtrat iar biomasa pretratată este spălată cu apă distilată în exces pentru îndepărtarea glicerinei, uscată la temperatura camerei și cântărită pentru a determina cantitatea de rumeguș pretratat. Această metodă este o versiune modificată după metoda utilizată de Guragain ș.a. [97].

Tabelul III.4 prezintă cantitățile de rumeguș obținute după pretratarea cu glicerină.

Tabelul III.4. Cantitățile de biomasă obținute după pretratarea a 100 mg rumeguș cu glicerină

Tip biomasă	Biomasă pretratată (mg)	
	Glicerină pură	Glicerină reziduală
BRAD	87,21	91,87
SALCÂM	90,04	93,81
STEJAR	91,21	92,91
PLOP	92,04	95,89

III.2.2.3. Pretratarea biomasei lignocelulozice cu lichide ionice

În flacoane de 5 ml închise etanș se introduce 100 mg rumeguș măcinat și uscat peste care se adaugă 2 ml de lichid ionic, după care se purjează argon. Probele se agită timp de 24 de ore la temperatura de 90°C. Lichidele ionice folosite la pretratarea rumegușului au fost: tetrafluoroborat de 1-etil-3-metilimidazoliu [Emim]BF₄, hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu [Bmim]PF₆, acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu [Emim]Ac și trifluoroacetat de 1-etil-3-metilimidazoliu [Emim]TFA. Probele se centrifughează timp de 15 minute la 6.000 rpm, iar din supernatant se ia 0,1 g pentru determinarea cantității de lignină dizolvată în lichid ionic. În continuare s-a adăugat treptat 20 ml apă distilată, agitându-se continuu, pentru a precipita celuloza dizolvată în lichid ionic și s-a filtrat pentru recuperarea biomasei pretratate. Biomasa pretratată este spălată cu 6 ml etanol, uscată la 80°C și cântărită pentru a determina cantitatea de rumeguș pretratat. Această metodă este o versiune modificată după metoda utilizată de Lee ș.a. [129].

Tabelul III.5 prezintă cantitățile de rumeguș obținute după pretratarea cu lichide ionice.

Tabelul III.5. Cantitățile de biomasă obținute după pretratarea a 100 mg rumeguș cu lichide ionice

Tip biomasă	Biomasă pretrată (mg)			
	[Emim]Ac	[Emim]TFA	[Bmim]BF ₄	[Bmim]PF ₆
BRAD	90,91	92,24	93,96	95,43
SALCĂM	81,94	84,21	97,91	90,23
STEJAR	89,01	91,21	89,32	94,09
PLOP	91,37	92,04	90,98	95,01

III.2.2.4. Pretratarea biomasei lignocelulozice cu metoda combinată acid sulfuric diluat/lichid ionic

Pretratarea biomasei lignocelulozice cu acid sulfuric s-a realizat conform punctului III.3.2.1.

Din biomasa pretrată cu acid sulfuric diluat (vezi Tabelul III.3) se cântăresc 100 mg rumeguș peste care se adaugă 2 ml de lichid ionic acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu [Emim]Ac. Probele se agită timp de 24 de ore la temperatura de 90°C. În continuare s-a adăugat treptat 20 ml apa distilată, agitându-se continuu, pentru a precipita celuloza dizolvată în lichid ionic și s-a filtrat pentru recuperarea biomasei pretratate. Biomasă pretrată este spălată cu 6 ml etanol, uscată la 80°C și cântărită pentru a determina cantitatea de rumeguș pretrat. Tabelul III.6 prezintă cantitățile de rumeguș obținute după pretratamentul cu acid lichid ionic.

Tabelul III.6. Cantitățile de biomasă obținute după pretratarea a 100 mg rumeguș cu metoda combinată acid sulfuric diluat/lichid ionic

Tip Biomasă	Biomasă pretrată (mg)
BRAD	91,21
SALCĂM	86,44
STEJAR	86,01
PLOP	92,17

III.2.2.5. Pretratarea biomasei lignocelulozice cu metoda combinată cu glicerină/lichid ionic

Pretratarea biomasei lignocelulozice cu glicerină pură s-a realizat conform punctului III.3.2.2.

Peste biomasa pretrată cu glicerină se adaugă 2 ml de lichid ionic acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu [Emim]Ac. Probele se agită timp de 24 de ore la temperatura de 90°C. În continuare s-a adăugat treptat 20 ml apa distilată, agitându-se continuu, pentru a precipita celuloza dizolvată în lichid ionic și s-a filtrat pentru recuperarea biomasei pretratate. Biomasă pretrată este spălată cu 6 ml etanol, uscată la 80°C și cântărită pentru a determina cantitatea de rumeguș pretrat. Tabelul III.7 prezintă cantitățile de rumeguș obținute după pretratamentul cu glicerină lichid ionic.

Tabelul III.7. Cantitățile de biomasă pretrată prin metoda combinată cu glicerină lichid ionic

Tip biomasă	Biomasă pretrată cu glicerină (mg)	Biomasă pretrată cu glicerină lichid ionic (mg)
BRAD	88,81	82,24
SALCAM	89,94	78,93
STEJAR	93,21	86,09
PLOP	95,04	89,01

III.2.3. Hidroliza enzimatică a biomasei pretratate și netratate

Într-un reactor de sticlă cu capacitatea de 50 cm³, termostatat la 40°C și cu agitare magnetică, s-au introdus 10 mg/ml biomasă pretrată în tampon acetat de sodiu de pH=4,8 și 5 μl/ml celulază Celluclast 1.5L nativă. Momentul adăugării enzimei a fost considerat momentul zero al reacției. Evoluția reacției de hidroliză a fost urmărită în timp, prin prelevare de probe la intervale stabilite, acestea fiind centrifugate, din supernatant determinându-se cantitatea de zaharuri totale (exprimate ca glucoză), prin metoda spectrofotometrică cu acid 3,5-dinitrosalicilic.

III.2.4. Dizolvarea biomasei lignocelulozice în DMSO/[Emim]Ac

Peste 100 mg de plop pretratat cu acid sulfuric diluat și 100 mg amestec standard (80% celuloză și 20% lignină kraft) s-a adăugat 4 ml DMSO/[EMIM]Ac raport 50:50 (% vol). Probele s-au încălzit și s-au agitat la 90°C timp de 6 ore. După separarea rezidului prin filtrare, în soluția care conține celuloza și lignina dizolvată, DMSO și lichid ionic s-a adăugat 30 ml apă distilată pentru regenerarea celulozei. Pentru o mai bună precipitare amestecul s-a agitat timp de 2 ore la 10°C. Reziduul nedizolvat care conține celuloza, hemiceluloza sau lignina nedizolvată s-a spălat bine cu apă distilată și s-a uscat. Celuloza precipitată s-a separat prin filtrare, s-a spălat cu apă, după care pentru îndepărtarea urmelor de lignină s-a albit timp de 8 ore la 50°C cu soluție de NaOH 0,1 N. Celuloza regenerată a fost caracterizată prin tehnica FT-IR. Celuloza regenerată a fost hidrolizată enzimatic utilizând celulaza Celluclast 1.5L nativă și imobilizată prin metoda II cu silanii MeTMOS/TMOS în raport 3:1.

Lignina dizolvată în lichid ionic s-a recuperat prin adăugarea de apă în exces, și ținută la frigider timp de 48 ore, după care aceasta a fost separată prin filtrare. Lignina obținută a fost bine spălată, uscată și caracterizată prin tehnica FT-IR. Dizolvarea și regenerarea celulozei și ligninei este descrisă în Figura III.1.

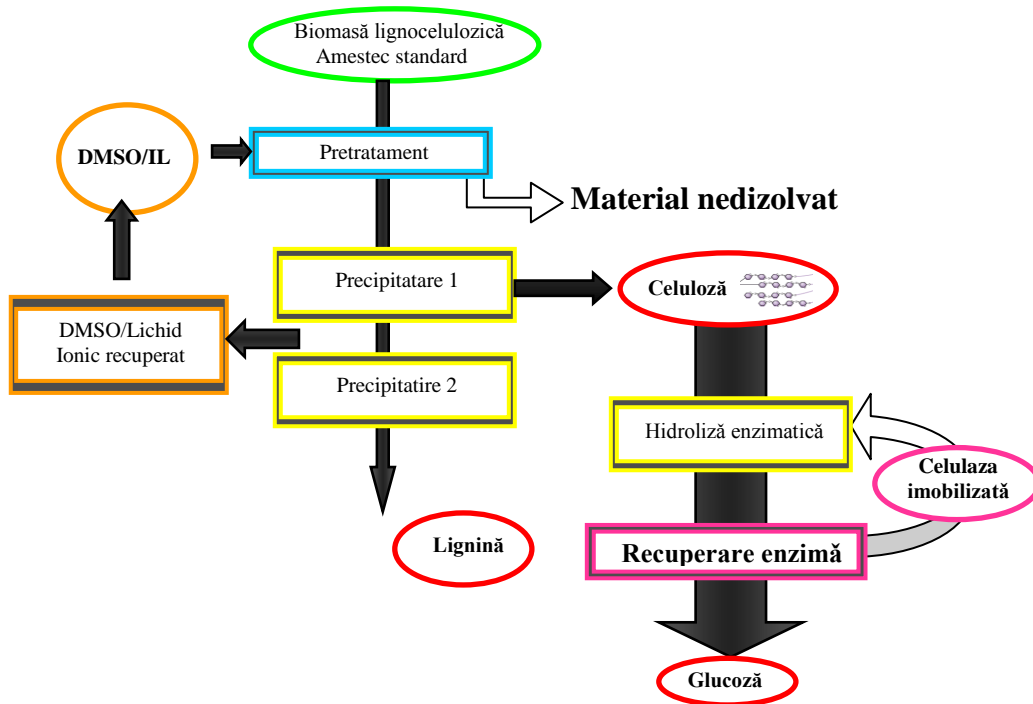


Figura III.1. Procesul de dizolvare și regenerare a celulozei și ligninei

III.2.5. Recuperarea soluției de DMSO/[EMIM]Ac

După regenerarea celulozei și ligninei dizolvate în DMSO/lichid ionic, soluția conține: lichid ionic, DMSO, apă, lignină neprecipitată. Soluția DMSO/[EMIM]Ac a fost repede recuperată după evaporarea apei. DMSO/[EMIM]Ac recuperat s-a reutilizat într-un nou ciclu al procesului.

III.2.6. Hidroliza enzimatică a celulozei

Într-un reactor de sticlă cu capacitatea de 50 cm³, termostatat la 50°C și cu agitare magnetică, s-au introdus 5 mg/ml, respectiv 10 mg/ml celuloză în tampon acetat de sodiu de pH=4,8 și 5 μl/ml celulază Celluclast 1.5L nativă sau 10 mg/ml celulază imobilizată. Volumul total al reacției a fost menținut la 10 ml. Momentul adăugării enzimei a fost considerat momentul zero al reacției. Evoluția reacției de hidroliză a fost urmărită în timp, prin prelevare de probe la intervale stabilite, acestea fiind centrifugate, din supernatant determinându-se cantitatea de zaharuri totale (exprimate ca glucoză), prin metoda spectrofotometrică cu acid 3,5-dinitrosalicilic. Cantitatea de glucoză eliberată după 24 ore de reacție a fost analizată și prin cromatografia de lichide.

III.2.7. Reutilizarea celulozei imobilizate

Pentru a reutiliza celuloza entrapată în sol-gel, 10 mg/ml preparat enzimatic s-a adăugat peste soluție 5 mg/ml celuloză Avicel PH101 regenerată din soluția DMSO/[Emim]Ac (pretratată) sau celuloză microcristalină Avicel (netratată), în tampon acetat de sodiu pH 4,8. Reacția de hidroliză s-a menținut la 50°C, iar volumul total de reacție a fost menținut la 10 ml. După hidroliza completă a celulozei, celuloza imobilizată s-a separat de soluția apoasă prin decantare, s-a spălat cu tampon acetat de sodiu după care s-a adăugat 5 mg/ml substrat. După 8 ore (atunci când s-a folosit ca substrat celuloza pretratată), respectiv 24 ore de hidroliză (atunci când s-a folosit ca substrat celuloza netratată) preparatul enzimatic s-a separat din nou prin decantare, s-a spălat, după care s-a completat cu celuloză până la atingerea concentrației de 5 mg/ml. Pentru fiecare reacție volumul total a fost menținut la 10 ml.

III.3. Metode de analiză

III.3.1. 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 fosfoframaților din reactivul Folin-Ciocalteu de către compușii fenolici din proteină (în special tirozina) [178].

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 III.8 de mai jos.

Tabelul III.8. 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	0,0496	0,02
3.	0,04	0,16	0,0957	0,04
4.	0,06	0,14	0,1442	0,06
5.	0,08	0,12	0,2022	0,08
6.	0,10	0,10	0,2538	0,10
7.	0,12	0,08	0,2838	0,12
8.	0,14	0,06	0,3342	0,14
9.	0,16	0,04	0,3562	0,16
10.	0,18	0,02	0,4349	0,18
11.	0,20	-	0,4169	0,20

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

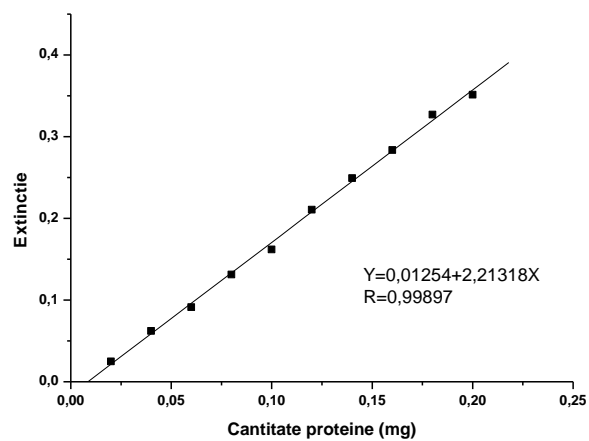
$$E = b \cdot C_p$$

unde:

E este extincție

b este panta dreptei

C_p este cantitate de proteină, (mg)

**Figura III.2.** Caracteristica de etalonare a soluției de BSA prin metoda Lowry

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 lasat 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:

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

unde:

- 5 este diluția probei la 1 ml
- F este factorul de diluție al soluției enzimaticice

Calculul cantității de proteină imobilizată

Cantitatea de proteină imobilizată se calculează cu formula:

$$C_{\text{Proteina imobilizata}} = C_i \cdot V - C_f \cdot V_{\text{filtrat}} \text{ (mg)}$$

Unde:

- C_i este cantitatea de proteină din enzima nativă (mg/ml)
- C_f este cantitatea de proteină din filtratul obținut la spălarea preparatului enzimatic (mg/ml)
- V este volumul de enzimă introdus la imobilizare (ml)
- V_{filtrat} este volumul de filtrat (ml)

Determinarea randamentului de imobilizare

Randamentul de imobilizare se calculează cu formula:

$$\eta_{\text{imobilizare}} = \frac{C_{\text{Proteina imobilizata}}}{C_i \cdot V} \cdot 100 \text{ (\%)}$$

Unde:

- $C_{\text{Proteina imobilizata}}$ este cantitatea de proteină imobilizată (mg)
- C_i este cantitatea de proteină din enzima nativă (mg/ml)
- V este volumul de enzimă introdus la imobilizare (ml)

II.3.2. Determinarea activității celulazice cu acid 3,5-dinitro-salicilic

Pentru caracterizarea celulelor utilizate la hidroliza enzimatică, s-a determinat activitatea celulazică pe substrat de carboximetilceluloză (CMC) și

celuloză microcristalină de la Macherey Nagel, utilizând metoda cu acid 3,5-dinitro-salicilic (DNS) [179].

Prepararea reactivilor 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 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.

c. Celuloză microcristalină 2%

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

Intr-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.

d. Soluția de celulază

Se lucrează cu soluțiile de celule achiziționate (celulaza Celluclast 1.5L)

e. Celulază immobilizată

Determinarea activității celulei native Celluclast 1,5 L

Mod de lucru

Modul de lucru schematic este prezentat în Tabelul III.9. Se pipetează în eprubeta cu probă 5 μl/ml celulază Celluclast 1.5L în 0,5 ml tampon acetat de sodiu pH 4,8, 0,05M și se incubează 2 minute la 50°C, după care se pipetează 0,5 ml soluție substrat CMC atât în eprubeta cu probă cât și în celelalte eprubete. Se incubează proba 30 minute la 50°C, după care se adaugă 0,5 ml soluție de celulază în eprubeta cu martorul.

Tabelul III.9. Mod de lucru schematic al determinării activității celulazei

Reactivi	Proba	Martor
Celulază nativă (μl/ml)	5	-
Tampon acetat de sodiu pH 4,8, 0,05M	0,5	0,5
Incubare 2 minute la 50°C		
Soluție substrat 2%	0,5	0,5
Incubare 30 minute la 50°C		
Celulază nativă (μl/ml)	-	5

Determinarea cantității de glucoză eliberate în timpul reacției s-a calculat conform secțiunii III.4.4.

În două eprubete s-au pipetat:

Probă:

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

Blanc:

- 0,4 ml tampon acetat de sodiu 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 la $\lambda = 575 \text{ nm}$.

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 eliberată din probă se calculează cu formula:

$$C_G = \frac{(E_P - E_M)}{1,54896} \cdot \text{dilutia proba [mg glucoza]}$$

Activitatea celulazei se calculează în raport cu glucoza eliberată prin hidroliza substratului 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:

$$A_{\text{CMC}} = \frac{\text{mg glucoză eliberată} \cdot 1000}{180 \cdot 0,5 \cdot 30} \cdot \text{dilutia [U/ml enzima]}$$

Determinarea activității celulazei imobilizate

Mod de lucru

Modul de lucru schematic este prezentat în Tabelul III.10 Se introduce în eprubeta cu probă 50 mg celulază imobilizată, 0,5 ml tampon acetat de Na pH=4,8,

se incubează 2 minute la 50°C, după care se adaugă și 0,5 ml soluție substrat (CMC) atât în eprubeta cu probă cât și în martor și se incubează 30 minute la 50°C, după care se adaugă 50 mg celuloză imobilizată în eprubeta cu martorul.

Tablelul III.10. Mod de lucru schematic al determinării activității celulazei

Reactivi	Proba	Martor
Celuloză imobilizată (mg)	50	-
Soluție tampon acetat de pH = 4,8	0,5	0,5
Incubare 2 minute la 50°C		
Soluție substrat 2%	0,5	0,5
Incubare 30 minute la 50°C		
Celuloză imobilizată (mg)	-	50

Determinarea cantității de glucoză eliberate în timpul reacției s-a calculat conform secțiunii III.4.4.

În două eprubete s-au pipetat:

Probă:

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

Blanc:

- 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 la $\lambda = 575 \text{ nm}$.

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 eliberată din probă se calculează cu formula:

$$C_G = \frac{(E_P - E_M)}{1,54896} \cdot \text{dilutia proba [mg glucoza]}$$

Activitatea celulazei se calculează în raport cu glucoza eliberată prin hidroliza substratului și se exprimă în unități. O unitate reprezintă cantitatea de enzimă aflată într-un mg enzimă imobilizată 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:

$$A_{\text{CMC}} = \frac{\text{mg glucoză eliberată} \cdot 1000}{180 \cdot 50 \cdot 30} \quad [\text{U/mg preparat}]$$

Randamentul de regăsire a activității enzimatică la 30 minute este:

$$\eta_{\text{regăsire a activității}} \% = \frac{A_{\text{enz.imob.}} \cdot m}{A_{\text{enz.libere}} \cdot v} \cdot 100$$

unde m este cantitatea enzimei obținută după imobilizare (mg)

v este volumul enzimei supusă imobilizării (ml)

$A_{\text{enz.imob.}}$ este activitatea enzimei imobilizate (U/mg)

$A_{\text{enz.libere}}$ este activitatea enzimei libere introduse la imobilizare (U/ml)

Determinarea activității celulozei în prezența lichidelor ionice

Pentru determinarea activității celulozei în prezența lichidului ionic diferite cantități de lichid ionic (încălzit la 50°C înainte de a adăuga enzima) au fost introduse în reacția de hidroliză enzimatică a celulozei microcristaline de la Macherey Nagel. Peste 2% celuloză în tampon acetat de sodiu, 0,05M pH 4,8 s-a adăugat 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% lichid ionic. Probele s-au încălzit la 50°C după care s-a adăugat 5 μl/ml celuloză nativă Celluclast 1.5L, respectiv 50 mg/ml celuloză imobilizată (Metoda II, silanii precursori MeTMOS:TMOS în raport molar 3:1). În paralel s-au efectuat probe martor care conțin aceleași cantități de substrat și lichid ionic. Activitatea celulozică s-a determinat prin măsurarea cantității de glucoză eliberată în urma reacției după 30 minute de reacție. Cantitatea de glucoză s-a calculat prin diferența extincțiilor probei și martorului, formula de calcul fiind prezentată mai sus.

III.3.3. Determinarea conținutului total de lignină și hidrați de carbon din biomasă

Prepararea reactivilor necesari

- *Rumeguș uscat și măcinat* : rumegușul s-a uscat la etuvă la 100°C până la greutate constantă.
- *Acid sulfuric 72%*

Hidroliza acidă

Mod de lucru

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 [180].

Determinarea ligninei insolubile în acid

Mod de lucru

Soluțiile hidrolizate în cuptor la 120°C s-au filtrat la vid utilizând creuzetele de filtrare cântărite anterior. Din filtratul rezultat s-a 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 [180]. Cantitatea de **lignină insolubilă în acid** se calculează cu relația:

$$\% \text{AIL} = \frac{(m_{\text{creuzet+reziduu}} - m_{\text{creuzet}}) - (m_{\text{creuzet+cenusa}} - m_{\text{creuzet}})}{300} \cdot 100$$

unde:

300 mg fiind cantitatea de rumeguș supusă hidrolizei

Determinarea ligninei solubile în acid

Mod de lucru

S-a citit absorbanta probelor de soluție hidrolizată la $\lambda=280$ nm față de apă distilată, utilizând un spectrofotometru UV-VIS (Jasco-V-530). Unde a fost cazul, probele s-au diluat cu apă distilată pentru a aduce absorbanta în domeniul 0,7-1 și s-a notat diluția [180].

Cantitatea de **lignină solubilă în acid** se calculează cu relația:

$$\% \text{ASL} = \frac{E_{\text{probă}} \cdot V_{\text{filtrat}} \cdot \text{diluția}}{\varepsilon \cdot 300}$$

unde:

300 mg fiind cantitatea de rumeguș supusă hidrolizei

$\varepsilon_{\text{plop}} = 25 \text{ L/g}\cdot\text{cm}$

$\varepsilon_{\text{stejar}} = 25 \text{ L/g}\cdot\text{cm}$

$\varepsilon_{\text{brad}} = 12 \text{ L/g}\cdot\text{cm}$

$\varepsilon_{\text{salcâm}} = 12 \text{ L/g}\cdot\text{cm}$

Conținutul **total de lignină** al probelor se calculează cu relația:

$$\% \text{ Lignină totală} = \% \text{AIL} + \% \text{ASL}$$

Determinarea conținutului de lignină solubilă în lichid ionic și glicerină

Reactivi necesari

- a. Soluție NaOH 0,1 N
- b. Soluții standard de lignina Kraft

Prepararea soluțiilor standard de lignină

Se prepară o soluție de lignină 1,0 mg/ml soluție NaOH 0,1 N. Din această soluție se iau câte 1 ml peste care se adaugă soluție NaOH 0,1 N. Modul de lucru schematic este prezentat în Tabelul III.11.

Tabelul III.11. Prepararea soluțiilor standard de lignină

Soluție Lignină (ml)	Soluție NaOH 0,1 N(ml)	Diluție	Concentrație (mg/ml)
1,0	49	1 :50	0,02
1,0	32,3	1 :33,3	0,03
1,0	19	1 :20	0,05
1,0	15,67	1 :16,67	0,06
1,0	13,28	1 :14,28	0,07

Standardele de lignină se spectrofotometrează la 280 nm, citirea făcându-se față de alb (ce conține soluție NaOH 0,1 N). 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 lignină în funcție de cantitatea de lignină. Această reprezentare (Figura III.3.) este de forma unei drepte având ecuația:

$$E = a + b \cdot C_L$$

unde:

- E este extincția
- C_L este cantitatea de lignină, mg/ml
- a este ordonata la origine
- b este panta dreptei

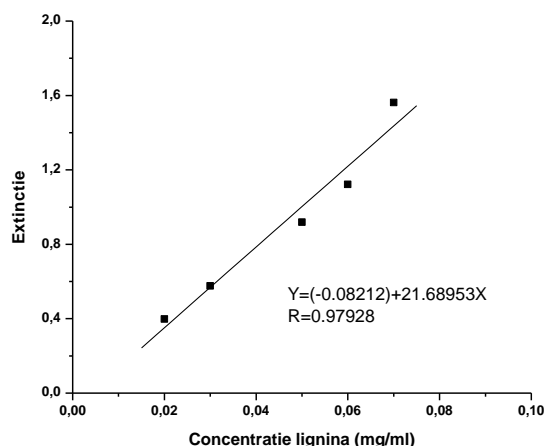


Figura III.3. Etalonare standarde de lignină

Determinarea cantității de lignină solubilă

După centrifugarea probelor, din supernatant se ia 0,1 g pentru determinarea cantității de lignină dizolvată în lichid ionic, glicerină sau dimetilsulfoxid/lichid ionic peste care se adaugă 0,9 g soluție NaOH 0,1 N. Cuvele se spectrofotometrează la 280 nm, citirea făcându-se față de blanc (contine 0,9 g soluție NaOH 0,1 N, 0,1 g lichid ionic, glicerină, respectiv DMSO/[Emim]Ac).

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. Această metodă este o variantă modificată a metodei aplicate de Sun ș.a. [125].

Cantitatea de **lignină solubilă** se calculează cu formula :

$$C_{\text{Lignina}} = \frac{(E_p + 0,08212)}{21,68953} \cdot \text{dilutia} \cdot V \text{ [mg lignina]}$$

unde:

V este volumul total de reacție

III.3.4. Determinarea conținutului de hidrați de carbon

Determinarea conținutului de hidrați de carbon cu acid 3,5-dinitrosalicilic

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)

Intr-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 pastrează 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 III.12.

Tabelul III.12. 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 III.13. 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 [181].

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

Tabelul III.13. 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 III.4) este de forma unei drepte având ecuația:

$$E = a + b \cdot C_G$$

unde:

E este extincția

C_G este cantitatea de glucoză, mg/ml

a este ordonata la origine

b este panta dreptei

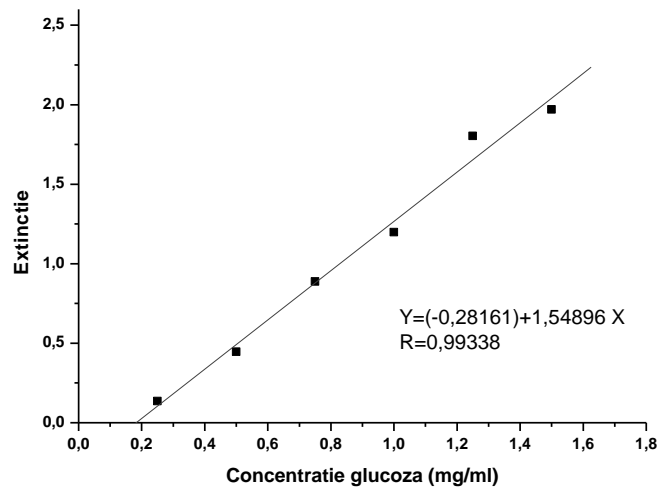


Figura III.4. Etalonare standarde de glucoză

Analiza hidraților de carbon totali după hidroliza 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 la $\lambda = 575$ nm la spectofotometrul UV-VIS (Jasco-V-530). Unde a fost cazul, probele s-au diluat cu apă distilată pentru a aduce absorbanta în domeniul dreptei de etalonare și s-a notat diluția.

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

$$C_G = \frac{(E_p + 0,28161)}{1,54896} \cdot \text{diluția} \cdot V \text{ [mg glucoza]}$$

unde:

V - volumul total de reacție

Randamentul de hidroliză s-a calculat cu formula:

$$\eta_{\text{Hidroliza}} = \frac{C_{\text{ZAHAR ELIBERAT}}}{C_{\text{ZAHAR TOTAL}}} \cdot 100[\%]$$

unde:

$C_{\text{ZAHAR ELIBERAT}}$ este cantitatea totală de zahar eliberată în timpul hidrolizei enzimatic

$C_{\text{ZAHAR TOTAL}}$ este cantitatea totală de zahar din biomasa lignocelulozică sau din celuloză

Analiza hidraților de carbon prin cromatografia de lichide

Analiza cantitativă în cromatografie se bazează pe principiul că în condițiile unui răspuns liniar al detectorului, aria picului este proporțională cu cantitatea componentei căreia îi corespunde picul, indiferent de forma picului.

Pentru a se putea realiza analize cantitative prin metoda HPLC, s-a realizat etalonarea cu cantități cunoscute din hidrații de carbon respectivi. Aceste etalonări s-au făcut pentru glucoză, zaharul cel mai important care rezultă în urma hidrolizei enzimatică a celulozei.

Determinările cromatografice au fost efectuate cu ajutorul cromatografului de lichide HPLC Jasco echipat cu detector cu indice de refracție și coloană Zorbax NH₂ (Agilent Technologies) Condiții de analiză pentru probe:

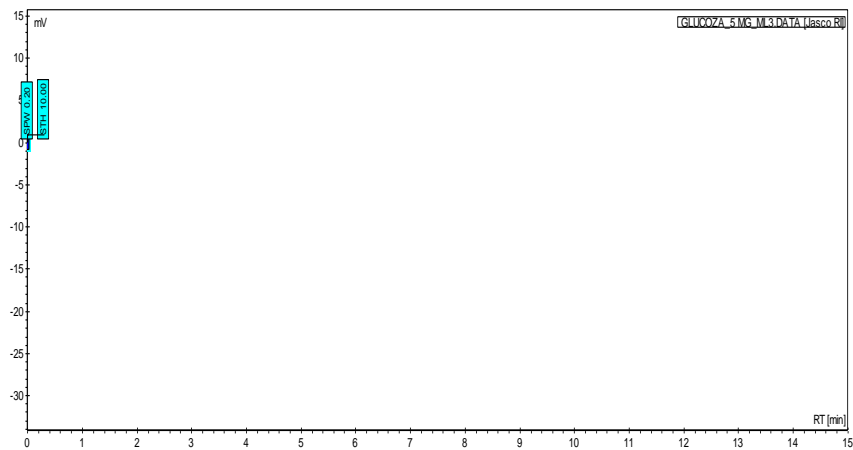
- Temperatură coloană: 20°C
- Fază mobilă: acetonitril: apă (65:35)
- Debit fază mobilă: 0.7 ml/min
- Volum de injectare: 20 μl

S-au cântărit cantități corespunzătoare de glucoză, astfel încât să se obțină concentrațiile redată în Tabelul III.14. Se prepară o soluție de glucoză de 10,0 mg/ml în acetonitril apă (65:35). Din aceste soluții se iau diferite volume și se diluează cu soluție stoc (acetonitril: apă în raport 65:35) . Modul de lucru schematic este prezentat în Tabelul III.14.

Cromatograma standardului de glucoză este prezentată în Figura III.5.

Tabelul III.14. Prepararea soluțiilor standard de glucoză

Soluție Glucoză (ml)	Soluție acetonitril:apă (ml)	Concentrație (mg/ml)
0,1	0,9	1
0,2	0,8	2
0,3	0,7	3
0,4	0,6	4
0,5	0,5	5

**Figura III.5.** Cromatograma HPLC a glucozei standard (5 mg/ml glucoză)

Se face reprezentarea grafică a ariilor standardelor de glucoză în funcție de cantitatea glucozei. Această reprezentare (Figura III.6) este de forma unei drepte având ecuația:

$$A = a + b \cdot C$$

unde:

A este aria picului

C_G este cantitatea componentului standard, mg/ml

a este ordonata la origine

b este panta dreptei

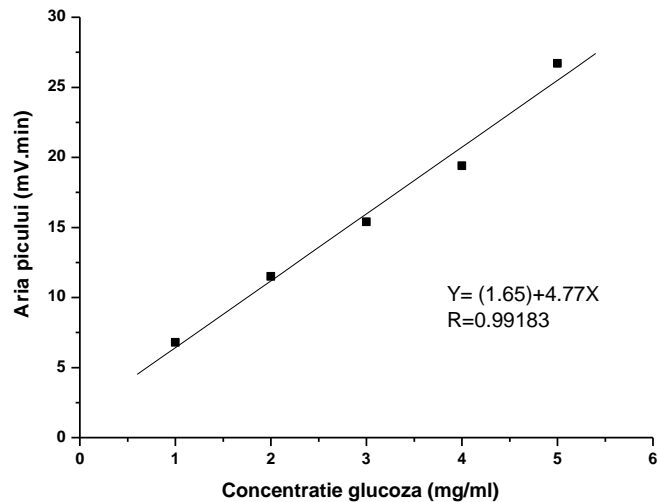


Figura III.6. Graficul de etalonare pentru glucoză

Cantitatea de glucoză care a fost eliberată prin hidroliză enzimatică în intervalul de timp considerat, s-a calculat cu relația:

$$C_G = \frac{(A - 1.65)}{4.77} \cdot \text{dilutia [mg/ml glucoza]}$$

unde:

A este aria picului (mV·min)

C_G este cantitatea de glucoză (mg)

III.3.5. Analiza FT-IR (spectrofotometrie de infraroșu cu transformată Fourier)

Spectrele IR s-au determinat cu ajutorul spectrofotometrului FT-IR Prestige21 (Shimadzu, Japonia), pe domeniul de lungime de undă 4000-400 cm^{-1} .

Elementele componente ale spectrofotometrului FT-IR sunt:

Sursa: tuburi ceramice

Interferometru: interferometru Michaelson

Detector: DLATGS

Domeniu de lungime de undă: 7800-350 cm^{-1}

Rezoluție: 0.5-16 cm^{-1}

Raport semnal/zgomot=40000:1

Mod de lucru

Analiza ligninei și celulozei

Un vârf de spatulă din proba de analizat s-a mojarat cu aproximativ 100 mg KBr, s-a introdus în compartimentul de probă, s-a presat în vederea obținerii pastilei

de IR și s-a analizat la spectrofotometrul FT-IR utilizând ca referință o pastilă de KBr.

III.3.6. Marcarea proteinelor cu fluorocromi

Peste 1 ml celulază Celluclast 1.5L (124,03 mg proteină/ml) și 1 ml tampon fosfat de potasiu 0,1 M, pH 7,8 s-a adăugat în picături 1 ml soluție izocianat de fluoresceină (2 mg/ml FITC dizolvat în N,N-dimetilformamidă). Reacția de cuplare s-a realizat într-un flacon de sticlă de 4 ml, prin incubarea probei la întuneric sub folie de aluminiu, timp de o oră la frigider (conform PIERCE EZ-Label™ FITC Labelling Kit). Separarea FITC libere de cea legată de proteină s-a făcut prin centrifugarea probei cu ajutorul unui tub de centrifugare cu filtru Centricon PL-30 (prevăzut cu membrană nominală de separare cu limita de masă moleculară de 30.000 Da) și spălarea repetată cu apă distilată a supernatantului până când absorbția fracțiunilor colectate la lungimea de undă de 493 nm, corespunzătoare FITC, a fost de aproximativ 0,1.

După separarea FITC libere de cea legată de proteină, s-a determinat cantitatea de proteină din supernatant, care conține proteina legată de soluția de fluoresceină, iar dacă cantitatea de proteină a fost mai mică decât cantitatea inițială de proteină introdusă în reacție, proba s-a concentrat prin centrifugare cu ajutorul tubului de centrifugare cu filtru Centricon PL-30. 0,2 ml suspensie s-a folosit la imobilizare. Imaginile fluorescente au fost înregistrate cu ajutorul microscopului cu fluorescență Leika True Confocal Scanner (Leika TCS SPE).

IV. CONCLUZII FINALE

Din studiile experimentale, efectuate în conformitate cu obiectivele stabilite, au rezultat următoarele concluzii:

Îmbunătățirea eficienței hidrolizei enzimatică a celulozei prin pretratarea biomasei lignocelulozice

1. Prin pretratarea biomasei cu acid sulfuric diluat s-a îmbunătățit randamentul de hidroliză a celulozei din salcâm, stejar și plop.
2. Pretratamentul cu glicerină pură și reziduală, a determinat creșterea eficienței de hidroliză enzimatică a celulozei din toate tipurile de biomasă studiate. Pretratamentul cu glicerină pură a dus în general la viteze de hidroliză mai mari comparativ cu cea reziduală, ceea ce era de așteptat în condițiile în care glicerina reziduală conține și o serie de alți compuși care pot avea efect inhibitor, însă această viteză diferită de hidroliză nu a afectat productivitatea enzimei. Glicerina pură a dizolvat o cantitate mai mare de lignină din lemnul de esență moale comparativ cu lemnul de esență tare
3. Lichidele ionice [Bmim]BF₄, [Bmim]PF₆ au fost ineficiente în pretratarea biomasei, cantitățile de zaharuri obținute pe tot parcursul reacției. Lichidul ionic [Emim]Ac a fost cel mai eficient în pretratarea biomasei, acesta ducând la obținerea celor mai mari randamente de hidroliză și a fost capabil să dizolve lignina din biomasă. Dintre cele patru tipuri de biomasă pretratate cu [Emim]Ac, plopul pretratată a fost hidrolizat cu eficiența cea mai mare.
4. Dintre metodele simple de pretratare studiate, pretratarea biomasei cu glicerină, respectiv [Emim]Ac a fost mai eficientă pentru hidroliza enzimatică a celulozei decât pretratarea cu acid diluat. Nu s-au observat diferențe semnificative ale randamentelor de hidroliză, pe tot parcursul reacției, ale celulozei din biomasa de stejar pretratată cu [Emim]Ac, respectiv cu glicerină pură. În cazul rumegușului de salcâm, pretratarea cu glicerină pură a fost mai eficientă pentru hidroliza celulozei decât pretratarea biomasei cu [Emim]Ac. Pe tot parcursul reacției, randamentele de hidroliză ale bradului și plopului pretratată cu [Emim]Ac au fost mai mari decât ale biomasei pretratate cu glicerină pură.
5. Pretratarea biomasei lignocelulozice prin metodele combinate cu acid sulfuric diluat/[Emim]Ac, respectiv glicerină/[Emim]Ac au fost mai eficiente pentru hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă, decât pretratarea simplă cu acid sulfuric, glicerină, respectiv lichid ionic. Dintre metodele de pretratare combinate studiate, metoda combinată de pretratare cu glicerină/[Emim]Ac a fost cea mai eficientă pentru hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă decât metoda cu acid/[Emim]Ac.

Optimizarea pretratamentului cu DMSO/[Emim]Ac pentru recuperarea celulozei și ligninei dizolvate și reutilizarea solventului

1. Pentru a reduce costurile energetice, costurile de proces și pentru a preveni degradarea celulozei s-a ales ca dizolvarea biomasei în DMSO/[Emim]Ac să se realizeze la 90°C, timpul de 6 ore și la concentrația DMSO/[Emim]Ac 50:50 (% vol).
2. Soluția DMSO/[Emim]Ac în raport 50:50 (% vol) a dizolvat complet celuloza Avicel și lignina standard după 6 ore de pretratare la 90°C, în timp ce doar 56,53%

celuloză, respectiv 22,92 % lignină au fost dizolvate din rumegușul de plop pretrat cu acid sulfuric diluat.

3. Soluția de DMSO/[Emim]Ac s-a reutilizat de 4 ori, însă capacitatea de dizolvare a celulozei și ligninei a scăzut după fiecare ciclu de utilizare, aceasta datorându-se acumulării cantității de lignină în soluție. La al patrulea ciclu de utilizare solventul a dizolvat aproximativ 64% celuloză și 82% lignină din amestecul standard, respectiv 29% celuloză și 3% lignină din plopul pretrat.

4. S-a precipitat o cantitate mai mare de lignină din solvent pentru proba de amestec standard, decât pentru proba de plop, indiferent de numărul de cicluri de utilizare.

5. Analiza prin spectrofotometrie FT-IR a arătat că celuloza și lignina nu au suferit modificări structurale însemnate în timpul proceselor de dizolvare în amestecul DMSO/[Emim]Ac urmată de reprecipitare. Micile diferențe observate între spectrul FT-IR ale celulozei regenerate și al celulozei standard Avicel PH101, se datorează scăderii gradului de cristalinitate al celulozei după dizolvare.

Îmbunătățirea performanțelor catalitice ale celulozei prin imobilizarea enzimei prin tehnica entrapării în sol-gel

1. S-a realizat imobilizarea eficientă a celulozei din *Trichoderma reesei* indiferent de metodele și condițiile de imobilizare folosite, randamentele de imobilizare variind între 70-96%.

2. Dintre preparatele obținute prin metoda I de imobilizare, preparatul celulozic care a înregistrat cea mai mare activitate catalitică, a fost cel obținut cu amestecul de trei silani precursori feniltrimetoxisilan/metiltrimetoxisilan/tetrametoxisilan în raport molar 1,6:0,4:1 și TWEEN80. Surfactantul TWEEN80 s-a dovedit a fi cel mai eficient aditiv, indiferent de amestecul de silani precursori folosit la imobilizare.

3. În cazul metodei II de imobilizare, creșterea concentrației silanului precursor MeTMOS a determinat creșterea activității catalitice. Folosirea silanilor cu grupări amino a dus la scăderea semnificativă a eficienței catalitice. Prin creșterea concentrației de silani cu grupări amino a scăzut activitatea catalitică a celulozei imobilizate.

4. Deoarece, preparatul enzimatic obținut prin Metoda II de imobilizare cu silanii precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 2:1 a avut cea mai bună eficiență catalitică, randamentul total de regăsire al activității catalitice fiind de aproximativ 85%, această metodă s-a optimizat prin modificarea raportului silanilor precursori și cantității de enzimă introdusă la imobilizare. Preparatul celulozic care a înregistrat cea mai mare activitate catalitică, a fost cel obținut cu silanii precursori MeTMOS/TMOS de 3:1 și 44,46 mg enzimă/g preparat.

5. În reacția de hidroliză a celulozei microcristaline Avicel PH101, preparatul care a determinat obținerea celui mai mare randament de hidroliză de aproximativ 50%, după 24 ore de reacție, a fost cel obținut prin metoda II de entrapare în sol-gel, în care s-a folosit amestecul de silani precursori MeTMOS/TMOS în raport molar 3:1 și 44 mg enzimă/g preparat. Acest preparat a fost și cel mai eficient catalitic și s-a utilizat în studiile de stabilitate și reutilizare.

6. Experimentele realizate au demonstrat o reproductibilitate ridicată a metodei de imobilizare sol-gel.

7. Stabilitatea celulozei la valori mai mari de pH (6,2-7,4), de temperatură (60-80°C), la concentrații mai mari de produs (5-15 mg/ml), la depozitare, respectiv în timpul operării în soluție apoasă, s-a îmbunătățit după imobilizare.

8. În prezența lichidului ionic [Emim]Ac, celulaza nativă a fost mai stabilă decât enzima imobilizată, aceasta probabil datorându-se faptului că lichidul ionic pătrunde în matricea de sol-gel astfel inactivând mult mai repede enzima. Deși lichidele ionice sunt capabile să dizolve celuloza din biomasă, ele inactivează complexul celulazic, de aceea nu se pot folosi ca mediu de reacție în hidroliza enzimatică a celulozei, ci doar la pretratarea sau dizolvarea biomasei lignocelulozice.

Hidroliza enzimatică a celulozei utilizând celulaza imobilizată prin metoda sol-gel

1. Celulaza imobilizată prin entrapare în sol-gel a hidrolizat celuloza microcristalină Avicel, însă comparativ cu celulaza nativă, cantitățile de zaharuri eliberate au fost mai mici. Celulaza imobilizată a hidrolizat aproximativ 50% celuloză, după 24 ore de reacție, iar celulaza nativă a hidrolizat aproximativ 85% celuloză în același timp. Chiar dacă celulaza imobilizată a fost capabilă să hidrolizeze o cantitate mai mică de celuloză, aceasta prezintă o serie de avantaje cum ar fi stabilitate ridicată și posibilitatea de reutilizare.
2. Dizolvarea celulozei Avicel în soluția de DMSO/[Emim]Ac și regenerarea ei a fost benefică pentru reacția de hidroliză enzimatică a celulozei catalizată, atât de celulaza nativă cât și de celulaza imobilizată, deoarece a determinat creșterea cantității de zaharuri fermentescibile.
3. Deși cantitatea de proteină din preparatul celulazic a fost cu 40% mai mică decât din celuloza nativă, dizolvarea celulozei în DMSO/[Emim]Ac și regenerarea ei a determinat îmbunătățirea randamentului de hidroliză a celulozei catalizată de celulaza imobilizată, diferențele între randamentele obținute cu cele două enzime, nativă și imobilizată, pe tot parcursul reacției, fiind de aproximativ 10%.
4. Celulaza imobilizată a fost capabilă să hidrolizeze celuloza din plop. Cantitatea de zaharuri eliberată în urma hidrolizei celulozei din plop a crescut pe tot intervalul de timp studiat, în cazul ambilor biocatalizatori utilizați în reacție, astfel că după 24 ore aproximativ 70% din celuloză a fost hidrolizată de celulaza nativă, respectiv 50% de celulaza imobilizată.
5. Studiile cinetice efectuate au arătat că entraparea celulazei în matrici siliconice a determinat o scădere a constantei Michaelis-Menten (K_m), ceea ce dovedește o afinitate mai ridicată a celulazei imobilizate pentru celuloza Avicel. Creșterea rezistenței la transferul de masă datorat fenomenului de difuzie îngreunată apărut după imobilizare a determinat scăderea vitezei maxime și eficienței catalitice totale a celulazei imobilizate.

Creșterea cantității de zaharuri fermentescibile prin reutilizarea celulazei imobilizate prin tehnica entrapării în sol-gel

1. Celulaza imobilizată a fost reutilizată de nouă ori atunci când s-a folosit ca substrat celuloza Avicel regenerată, respectiv de șase ori atunci când s-a folosit ca substrat celuloza microcristalină Avicel, însă activitatea catalitică a scăzut după fiecare ciclu de utilizare. Activitatea celulazei imobilizate a fost mai mare, când reutilizarea s-a făcut pe substrat de celuloză Avicel regenerată, decât în cazul în care reutilizarea s-a realizat pe celuloză microcristalină Avicel. La a cincea reutilizare pe celuloză Avicel microcristalină, respectiv la a opta reutilizare pe celuloză Avicel regenerată, celulaza imobilizată a pierdut aproximativ 70% din activitatea inițială.

Bibliografie

- [1]. Mousdale D. M., *Biofuels: Biotechnology, Chemistry and Sustainable Development*, CRC Pres, USA, **2008**
- [2]. Demirbas A., *Energ Convers Manage*, **2009**, 50, 14-34
- [3]. Soetaert W., Vandamme E. J., *Adv Biochem Eng Biot*, , Jonh Wiley & Sons Ltd., Belgia, **2009**
- [4]. Gupta R.B., Demirbas A., *Gasoline, Diesel and Ethanol Biofuels from Grasses and Plants*, Cambridge University Press, SUA, British Library, **2010**
- [5]. Malyshev T., Custodio M., Hayworth C., Sadin B., Consoli V., *Biofuel for Truensport*, International Energy Agency, **2003**
- [6]. Purwadi R., Brandberg T., Taherzadeh M. J., *Int J Mol Sci*, **2007**, 8, 920-932
- [7]. McMillan J. D., Adney W. S., Mielenz J. R., Klasson T. K. *Appl Biochem Biotechnol*, **2006**, 12, 55-70
- [8]. <http://www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/biofuels-oecd-faoagriculturaloutlook2011-2020.htm> Data accesării: 03.09.2012
- [9]. Lange J.P., *Biofpr*, **2007**, 1, 39-48
- [10]. Dragota D., Moisescu V., *Biocarburanții în România*, SC Chiminform Data SA București, **2004**
- [11]. Yang S., *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, New technologies and Applications, Elsevier Science & Technology Books, SUA, British Library, **2007**
- [12]. <http://www.biotechallies.com/top-25-countries-for-ethanol-production-capacity> data accesării 29.05.2012
- [13]. Koutinas A. A., Wang R. H., Webb C., *Biofpr*, **2007**, 1, 24-38
- [14]. Dale B., *Biofpr*, **2007**, 1, 14-17
- [15]. <http://www.kansasbioenergy.com/how/process.html> data accesării: 19.02.2012
- [16]. Drapcho C.M., Nhuan N.P., Walker T.H., *Biofuels Engineering Process Technology*, S.U.A., **2008**
- [17]. Al-Zuhair S., Ramachandran K. B., Farid M., Aroua K. M., Vadlani P., Ramakrishnan S., Gardosi L., *Enzyme Research*, **2011**, doi:10.4061/2011/658263
- [18]. Laine C., *Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp*, Eds. KCL, Espoo, Finlanda, **2005**
- [19]. Hamelinck C. N, Van Hooijdonk G., Faaij A. P.C., *Biomass and Bioenerg*, **2005**, 28, 384-410
- [20]. Palonen H., *Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose*, Espoo, Finlanda, **2004**
- [21]. Cutsinger T., Christensen N., Master Project, *Cellulosic ethanol potential: an iowa case study*, Nicholas School of the Environment of Duke University, **2009**
- [22]. Gray K. A., Zhao L., Emptage M., *Curr Opin in Chem Biol*, **2006**, 10, 141-146
- [23]. Talebnia F., *Ph.D. thesis, Ethanol Production from Cellulosic Biomass by Encapsulated Saccharomyces cerevisiae*, Göteborg, Sweden, **2006**
- [24]. Genomics:GTL Roadmap, *U.S. Department of Energy Office of Science*, August **2005**
- [25]. Wang K., Yang H.Y., Xu F., Sun R. C., *Bioresource Technol*, **2011**, 102, 4524-4529

- [26]. Hendriks A.T.W.M., Zeeman G., *Bioresource Technol*, **2009**, 100, 10–18
- [27]. Girio F.M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L.C., Bogel-Lukasik S., *Bioresource Technol*, **2010**, 101, 4775-4800
- [28]. Saha B.C., *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2003**, 30, 279-291
- [29]. Hatakeyama H., Hatakeyama T., *Adv Polym Sci*, **2010**, 232, 1–63
- [30]. Doherty W.O.S., Mousavioun P., Fellows C.M., *Ind Crop Prod*, **2011**, 33, 259-276
- [31]. Guisan J. M., *Immobilization of Enzymes and Cells*, New Jersey, Humana Press, **2006**
- [32]. Lee HJ., Brown R.M., *J Biotechnol*, **1997**, 57, 127– 136
- [33]. <http://xray.bmc.uu.se/~wimal/projects/research.html> data accesării: 12.07.2012
- [34]. Juhasz T., Szengyel Z., Reczey K., Siika-Aho M., Viikari L., *Proc Biochem*, **2005**, 40, 3519-3525
- [35]. Boukraa-Oulad Daoud F., Kaddour S., Sadoun T., *Colloid Surface B*, **2010**, 75, 93-99
- [36]. Shallom D., Shoham Y., *Curr Opin Microbiol*, **2003**, 2, 219-228
- [37]. Ghose T.K., Bisaria V.S., *Pure Appl Chem*, **1987**, 59, 1739-1752
- [38]. Peter F., "Biotransformări Enzimatică", Editura Politehnica, Timișoara, **2005**
- [39]. Whittall J., Sutton S., *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations*, John Wiley & Sons Ltd, Belgia, **2010**
- [40]. Pedroche J., Yust M., Mateo C., Fernandez-Lafuente R., Giron-Calle J., Alaiz M., Vioque J., Guisan J., Millan F., *Enzyme Microb Tech*, **2007**, 40, 1160-1166
- [41]. Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banatb I.M., Marchantb R., Koutinasa A.A., *Food Microbiol*, **2004**, 21, 377–397
- [42]. Tischer W., Kasche V., *Els Sci*, **1999**, 17, 326-335
- [43]. Vandenberg E.T., Brown R.S., Krull U.J., *Immobilized Biosystems in Theory and Practical Applications*, Veliky, I.E. (Ed.), Elsevier, Holland, **1983**
- [44]. Dariush N., *Iran J Biotechnol*, **2003**, 1, 197-206
- [45]. Weetall, H.H., *Appl Biochem Biotechnol*, **1993**, 41, 157-188
- [46]. Miletić N., Nastasović A., Loos K., *Bioresource Technol*, **2012**, 115, 126–135.
- [47]. Doretta L., Ferrara D., Lora S., *Biosens Bioelectron*, **1993**, 8, 443-450
- [48]. Cao L., *Carrier-bound Immobilized Enzymes, Principles, Applications and Desing*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**
- [49]. Pierre A. C., *Biocatal Biotransform*, **2004**, 22, 145-170
- [50]. Avnir D., Coradin T., Lev O., Livaje J., *J Mater Chem*, **2006**, 16, 1013-1030
- [51]. Sakka S., *Sol-gel Science and Technology, Processing Characterization and Applications*, Kluwer Academic Publishers, SUA, **2005**
- [52]. Dickey F.H., *J Phys Chem*, **1955**, 58, 695-707
- [53]. Avnir D., Braun S., Lev O., Ottolenghi M., *Chem Mater*, **1994**, 6, 1605-1614
- [54]. Ellerby L.M., Nishida C.R., Nishida F., Yamanaka S.A., Dunn B., Valentine J.S., Zink J.I., *Science*, **1992**, 255, 1113-1115
- [55]. Flora K., Brennan J.D., *Chem Mater*, **2001**, 13, 4170-4179
- [56]. Ghosh S. K., *Functional Coating: by Polymer Microencapsulation*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**
- [57]. Avnir D., *Accounts Chem Res*, **1995**, 28, 328-334

- [58]. Sangeetha K., Morris V. B., Abraham T. E., *Appl Catal A-Gen*, **2008**, 341, 168-173
- [59]. Weiser D., Boros Z., Hornyanszky G., Toth A., Poppe L., *Process Biochemistry*, **2012**, 47 428-434
- [60]. Brinker C.J., Scherer G.W., *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, San Diego, **1990**
- [61]. Jordan J., Kumar C.S.S.R., Theegala C., *J Mol Catal B-Enzym*, **2011**, 68, 139-146
- [62]. Liu J., Cao X., *Process Biochem*, **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.016>
- [63]. Mishra C., Deshpande V., Raot M., *Enzyme Microb Tech*, **1983**, 5, 342-344
- [64]. Daoud F.B., Kaddour S., Sadoun T., *Colloid Surface B*, **2010**, 75, 93-99
- [65]. Jones P.O., Vasudevan P.T., *Biotechnol Lett*, **2010**, 32, 103-106
- [66]. Li C., Yoshimoto M., Fukunaga K., Nakao K., *Bioresource Technol*, **2007**, 98, 1366-1372
- [67]. Dincer A., Telefoncu A., *J Mol Catal B- Enzym*, **2007**, 45, 10-14
- [68]. Cheng Z., Wu C., Yang W., Xu T., *J Membrane Sci*, **2010**, 358, 93-100
- [69]. Darias R., Villalonga R., *J Chem Technol Biotechnol*, **2001**, 76, 389-493
- [70]. Abd El-Ghaffar M.A., Hashem M.S., *Carbohydr Polym*, **2010**, 81, 507-516
- [71]. Ogeda T. L., Silva I. B., Fidale L. C., El Seoud O. A., Petri D. F.S., *Journal of Biotechnology*, **2012**, 157, 246- 252
- [72]. Jabasingh S. A., Nachiyar C. V., *J Therm Anal Calorim*, **2012**, 109, 193-202
- [73]. Chang R.H., Jang J., Kevin C., Wu W., *Green Chem*, **2011**, 13, 2844-2851
- [74]. Lupoi J.S., Smith E.A., *Biotechnol Bioeng*, **2011**, 108, 2835-2843
- [75]. Hartono S. B., Qiao S. Z., Liu J., Jack K., Ladewig B. P., Hao Z., Lu G. X. M., *J. Phys. Chem. C*, **2010**, 114, 8353-8362
- [76]. Vidinha P., Augusto V., Almeida M., Fonseca I., Fidalgo A., Ilharco L., Cabral J.M.S., Barreiros S., *J Biotechnol*, 2006, 121, 23-33
- [77]. Tomin A., Weiser D., Hellner G., Bata Z., Corici L., Peter F., Koczka B., Poppe L., *Process Biochem*, 2011, 46, 52-58
- [78]. Paljevac M., Primožic M., Habulin M., Novak Z., Knez Z., *J Supercrit Fluid*, **2007**, 43, 74-80
- [79]. Andriani D., Sunwoo C., Ryu H.-W., Prasetya B., Park D.-H., *Bioprocess Biosyst Eng*, **2012**, 35, 29-33
- [80]. Takimoto A., Shiomi T., Ino K., Tsunoda T., Kawai A., Mizukami F., Sakaguchi K., *Microp Mesopor Mat*, **2008**, 116, 601-606
- [81]. Demirbas A., *Energ Convers Manage*, **2009**, 50, 14-34
- [82]. Al-Zuhair S., *Biofpr*, **2007**, 1, 57-66
- [83]. Kaparaju P., Serrano M., Thomsen A. B., Kongjan P., Angelidaki I., *Bioresource Technol*, **2009**, 100, 2562-2568
- [84]. Lynd L.R., J. Weimer P., van Zyl W. H., Pretorius I. S., *Microbio Mol Biol RI*, **2002**, 66, 506-577
- [85]. Becidan M., PhD thesis, *Experimental Studies on Municipal Solid Waste and Biomass Pyrolysis*, NTNU, Norvegia, **2007**
- [86]. Lynd L. R., *Annu. Rev. Energy Environ.*, **1996**, 21, 403-465
- [87]. Saxena R.C., Adhikari D.K., Goyal H.B., *Renew Sust Energ Reviews*, **2009**, 13, 167-178
- [88]. Lin Y., Tanaka S., *Appl Microbiol Biotechnol*, **2006**, 69, 627-642
- [89]. Sun Y., Cheng J. J., *Bioresource Technol*, **2005**, 96, 1599-1606

- [90]. Harun R., Jason W.S.Y., Cherrington T., Danquah M.K, *Renew Sust Energy Reviews*, **2010**, 85, 199-303
- [91]. Agbor V. B., Cicek N., Sparling R., Berlin A., Levin D. B., *Biotechnol Adv*, **2011**, 29, 675-685
- [92]. Mishima D., Tateda M., Ike M., Fujita M., *Bioresource Technol*, **2006**, 97, 2166-2172
- [93]. Balat M, Balat H., Oz C, *Prog Energy Combust*, **2008**, 34, 551-573
- [94]. Chandel AK, Chandrasekhar G., Radhika K., Rudravaram R, Ravindra P., *Biotechnol Mol Biol Rev*, **2011**, 6, 8-20
- [95]. Ruffell J., PhD Thesis, *Pretreatment and hydrolysis of recovered fibre for ethanol production*, The University of British Columbia, **2006**
- [96]. Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J., Stroeve P., *Ind Eng Chem Res*, **2009**, 48, 3713-3729
- [97]. Guragain Y. N., De Coninck J., Durand A., Rakshit S. K., *Bioresource Technol*, **2010**, 102, 4416-4440
- [98]. Olivier-Bourbigou H., Magna L., Morvan D., *Appl Catal A- Gen*, **2010**, 373, 1-56
- [99]. Maki-Arvela P., Anugwom I., Virtanen P., Sjöholm R., Mikkola J.P., *Ind Crop Prod*, **2010**, 32, 175-201
- [100]. Patachia S., Porzsolt A., Croitoru C., *Utilizarea lichidelor ionice ca solvenți ecologici în chimia verde*, Calitate Mediu, **2009**
- [101]. Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J., *Bioresource Technol*, **2010**, 101, 4851-4861
- [102]. Pinkert A., Marsh K.N., Pang S., Stainger M.P., *Chem Rev*, **2009**, 109, 6912-6728
- [103]. Eguchi K. , *Clean Energy Systems and Experiences*, Sciyo, Croația, **2010**
- [104]. Laus G., Bentivoglio G., Schottenberger H., Kahlenberg V., Kopacka H., Röer T., Sixta H., *Lenzinger Berichte*, **2005**, 84, 71-85
- [105]. Swatloski R. P., Spear S. K., Holbrey J. D., Rogers R. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 4974-4975
- [106]. Fort D. A., Remsing R. C., Swatloski R.P., Moyna P., Moyna G., Rogers R.D., *Green Chem*, **2007**, 9, 63-69
- [107]. Novoselov N. P., Sashina E. S. Petrenko V. E., Zaborsky M., *Fibre Chem.*, **2007**, 39, 153-158
- [108]. Yang F., Li L., Li Q., Tan W, Liu W, Xian M., *Carbohydr Polym* , **2010**, 81, 311-316
- [109]. Fukaya Y., Hayashi K., Wada M., Ohno H., *Green Chem.*, **2008**, 10, 44-46
- [110]. Vitz J., Erdmenger T., Haensch C., Schubert U. S., *Green Chem.*, **2009**, 11, 417-424
- [111]. Zavrel M., Bross D., Funke M., Büchs J., Spiess A.C., *Bioresource Technol*, **2009**, 100, 2580-2587
- [112]. Xiao W., Yin W., Xia S., Ma P., *Carbohydr Polym*, **2012**, 87, 2019- 2023
- [113]. Karatroz S.K., Edye L.A., Wellard R.M., *Cellulose*, **2012**, 19, 307-312
- [114]. Zhang J., Zhang H., Wu J., Zhang J., He J., *Phys Chem Chem Phys*, **2010**, 12, 1941-1947
- [115]. Tan S. S.Y., MacFarlane D.R., *Top Curr Chemistry*, **2009**, 290, 311-339.
- [116]. Tan S.S.Y, MacFarne D.R., Upfal J., Edye L.A., Doherty W.O.S., Patti A.F., Pringle J.M., Scott J.L., *Green Chem*, **2009**, 11, 437-592
- [117]. Zakrzewska M.E., Bogel-yukasik E., Bogel-yukasik R., *Energy Fuels*, **2010**, 24, 737-745

- [118]. Kim J.-Y., Shin E.-J., Eoma I.-Y., Wonb K., Kim Y. H., Choi D., Choi I.-G., Choi W. J., *Bioresource Technol*, **2011**, 102, 9020-9025
- [119]. Pinkert A., Goeke D.F., Marsh K.N., Pang S., *Green chem*, **2011**, 1-10
- [120]. Doherty W.O.S., Mousavioun P., Fellows C. M., *Ind Crop Prod*, **2011**, 33, 259-276
- [121]. Kilpeläinen I., Xie H., King A., Granstrom M., Heikkinen S., Argyropoulos D.S., *J Agr Food Chem*, **2007**, 55, 9142-9148
- [122]. Jiang M., Zhao M., Zhou Z., Huang T., Chen X., Wang Y., *Ind Crop Prod*, **2011**, 33, 734-738
- [123]. Wei L., Li K., Ma Y., Hou X., *Ind Crop Prod*, **2012**, 37, 227- 234
- [124]. Li Q., He Y.C., Xian M., Jun G., Xu X., Yang J.M., Li L.-Z., *Bioresource Technol*, **2009**, 100, 3570-3575
- [125]. Sun N., Rahman M., Qin Y., Mirela L., Maxim H., Rodríguez R. D. Rogers, *Green Chem*, **2009**, 11, 646-655
- [126]. Pu Y., Jiang N., Ragauskas A.J., *J Wood Chem Technol*, **2007**, 27, 23-33
- [127]. Li C., Knierim B., Manisseri C., Arora R., Scheller H.V., Auer M., Vogel K.P., Simmons B.A., Singh S., *Bioresource Technol*, **2010**, 101, 4900-4906
- [128]. Samayam I.P., Schall C.A., *Bioresources Technol*, **2010**, 101, 3561-3567
- [129]. Lee S. H., Doherty T. V., Linhardt R. J., Dordick J. S., *Biotechnol Bioeng*, **2008**, 102, 1368-1375
- [130]. Labbé N., Kline L. M., Moens L., Kim K., Kim P. C. , Hayes D. G., *Bioresource Technol*, **2012**, 104, 701-707
- [131]. Weerachanchai P., Leong S. S. J., Chang M. W., Ching C. B., Lee J.-M., *Bioresource Technol*, **2012**, 111453-459
- [132]. Moniruzzaman M., Ono T., *Biochem Eng J*, **2012**, 60, 156- 160
- [133]. Fehér E., Major B., Bélafi-Bakó K. and Gubicza L., *Biochem Soc T*, **2007**, 35, 1624-1627
- [134]. Baker S.N., McCleskey T.M., Pandey S., Baker A., *Chem. Commun.*, **2004**, 940-941
- [135]. Engel P., Mladenov R., Wulfhorst H., Jager G., Spiess A.C., *Green Chem*, **2010**, 12, 1959-1966
- [136]. Engel P., Krull S., Seiferheld B., Spiess A.C., *Bioresource Technol*, **2012**, 115, 27-34
- [137]. Bharadwaj R., Wong A., Knierim B., Singh S., Holmes B.M., Auer M., Simmons B.A., Adams P.D., Singh A.K., *Bioresource Technol*, **2011**, 102, 1329-1337
- [138]. Lozano P., Bernal B., Bernal J.M., Pucheault M., Vaultier M., *Green Chem*, **2011**, 13, 1406-1411
- [139]. Salvador A.C., Santos M.C., Saraiva J.A., *Green Chem*, **2010**, 12, 632-635
- [140]. Jørgensen H., Kristensen J. B., Felby C., *Biofpr*, **2007**, 1, 119-134
- [141]. Binder J. B., Raines R. T., *PNAS*, **2010**, 107, 4516-4521
- [142]. Mosier N.S., Ladisch C.M., Ladisch M.R., *Biotechnol Bioeng*, **2002**, 79, 610-618
- [143]. Clarke K., Li X., Li K., *Biomass Bioenrg*, **2011**, 35, 3943-3950
- [144]. Diaz M. J., Cara C., Ruiz E., Perez-Bonilla M., Castro E., *Fuel*, **2011**, 90, 3225-3229
- [145]. Kaar W.E., Holtzapple M., *Biotechnol Bioeng*, **1998**, 59, 419-427
- [146]. Börjesson J., Engqvist M., Sipos B., Tjerneld F., *Enzyme Microb Tech*, **2007**, 41, 186-195

- [147]. Giles R. L., Galloway E. R., Elliott G. D., Parrow M. W., *Bioresource Technol*, **2011**, 102, 8011–8016
- [148]. Liu L., Sun J., Li M., Wang S., Pei H., Zhang J., *Bioresource Technol*, **2009**, 100, 5853–5858
- [149]. Maeda R. N., Serpa V. I., Rocha V. A. L., Mesquita R. A. A., Santa Anna L. M. M., Machado de Castro A., *Process Biochem*, **2011**, 46, 1196–1201
- [150]. Lin L., Yan R., Liu Y., Jiang W., *Bioresource Technol*, **2010**, 101, 8217–8223
- [151]. Yeh A., Huang Y.-C., Chen S. H., *Carbohyd Polym*, **2010**, 79, 192–199
- [152]. Samaniuk J. R., Scott C. T., Root T. W., Klingenberg D. J., *Bioresource Technol*, **2011**, 102, 4489–4494
- [153]. Andersen N., PHD Thesis, *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, BioCentrum-DTU, Danemarca, **2007**
- [154]. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Peter F., Non-conventional pretreatment and hydrolysis of cellulosic raw materials for bioethanol production, The XIIIth International Symposium “Young People and Multidisciplinary Research”, Timișoara, România, **2011**, pg 28
- [155]. Macarie C. A., Segneanu A.E., Balcu I., Pop R., Burtica G., **Ungurean M.**, Grozescu I., Use of alkaline lyophilization process for lignocellulosic biomass pretreatment, *Dig J Nanomater Bios*, **2012**, 7, 1577-1586
- [156]. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Balcu F., Peter F., Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wood biomass, The XIIth International Symposium “Young People and Multidisciplinary Research”, Timișoara, România, **2010**, pg 13
- [157]. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Ursoiu A., Peter F., *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 52, 387-391, (citată în SCOPUS)
- [158]. Ivanoiu A., Schmidt A., Peter F., Rusnac L.M., **Ungurean M.**, Comparative Study on Biodiesel Synthesis from Different Vegetables Oils, *Chemical Bulletin of “Politehnica” University of Timisoara*, Series of Chemistry and Environmental Engineering, 2011, 56, 94-98
- [159]. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Ursoiu A., Peter F., Comparison of different pretreatment methods of lignocellulosic biomass: delignification and enzymatic hydrolysis, 12th Edition of Timisoara’s Academic Days, Timișoara, România, **2011**, pg 113
- [160]. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Peter F., Ionic liquid pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic materials by native and immobilized cellulases, 5th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Germania, **2010**, pg 264
- [161]. Tian X., Fang Z., Jiang D., Sun X., *Biotechnology for Biofuels*, **2011**, 4, 53-67
- [162]. **Ungurean M.**, Gubicza L., Csanádi Zs. and Peter F., „An integrated system of ionic liquid pretreatment and enzymatic hydrolysis of wood biomass, using immobilized cellulase”, în curs de evaluare la *Biotechnology for Biofuels*, 2013.
- [163]. Casas A., Palomar J., Alonso M. V., Oliet M., Omar S., Rodriguez F., *Ind Crop Prod*, **2012**, 37, 155– 163
- [164]. Toledano A., Serrano L., Garcia A., Mondragon I., Labidi J., *Chem Eng J*, **2010**, 157,93–99

- [165]. **Ungurean M.**, Paul C., Peter F., Cellulase immobilized by sol-gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose, *Bioprocess Biosyst Eng*, **2012**, DOI 10.1007/s00449-012-0835-9
- [166]. Xu J., Huo S., Yuan Z., Zhang Y., Xu H., *Biocat Biotransform*, **2011**, 29, 71–76
- [167]. Andrić P., Meyer S. A., Jensen P. A., Dam-Johansen K., *Appl Biochem Biotechnol*, **2010**, 160, 280-297
- [168]. Bélafi-Bakó K., Koutinas A., Nemestóthy N., Gubicza L., Webb C., *Enzyme Microb Technol*, **2006**, 38, 155–161
- [169]. Chang K., Thitikorn-amorn J., Chen S., Hsieh J., Ratanakhanokchai K., Huang P., Lin T., Chen S., *Bioresource Technol*, **2011**, 102, 519–523
- [170]. Bansal P., Hall M., Realf M.J., Lee J.H., Bommarius A.S., *Biotechnol Adv*, **2009**, 27, 833-848
- [171]. Bezerra R.M.F., Dias A.A., *Appl Biochem Biotechnol*, **2004**, 112, 173-184
- [172]. Balsan G., Astolfi V., Benazzi T., Meireles M.A.A., Maugeri .F, Di Luccio M., Dal Prá V., Mossi A.J., Treichel H., Mazutti M.A., *Bioprocess Biosyst Eng*, **2012**, 35, 1229-1237
- [173]. Berghem L. E. R, Petterson L. G., Axiö-Fredriksson U-B., *Eur J Biochem*, **1975**, 53, 55-62
- [174]. Yu Y., Yuan J., Wang Q., Fan X., Wang P., *Appl Biochem Biotechnol*, **2012**, 166, 1433-1441
- [175]. Zarcula C., Corici L., Croitoru R., Ursoiu A., Peter F., *J Mol Catal B-Enzym* , **2010**, 65, 79–86
- [176]. Kawakami K., Yoshida S., *J Ferment Bioeng*, **1996**, 82, 239-245
- [177]. Bower S., Wickramasinghe R., Nagle N. J., Schell D. J., *Bioresource Technol*, **2008**, 99, 7354–7362
- [178]. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.L., *J Biol Chem*, **1951**, 193, 265-275
- [179]. Miller, G. L., *Anal Chem*, 31, **1972**, 426-428
- [180]. Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., and Crocker D., *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*, NREL/TP-510-42618, **2008**
- [181]. Ghose T.K, *Pure Appl Chem* 2, **1987**, 257–268

ANEXE

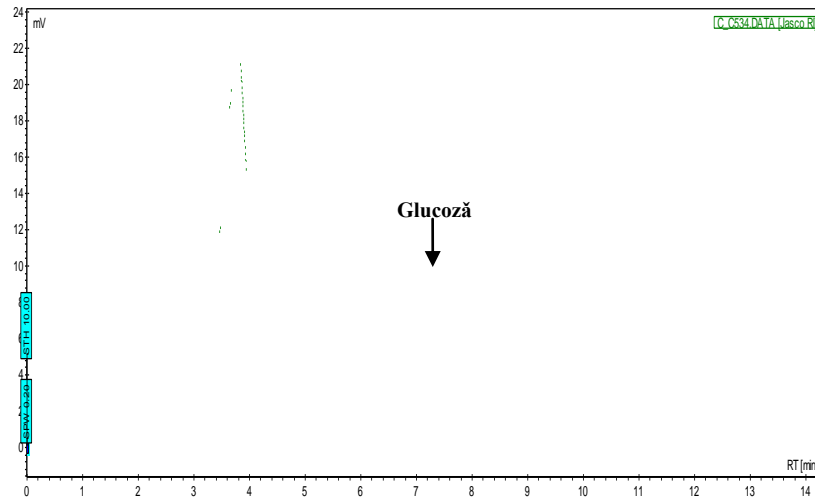


Figura 1. Cromatograma HPLC a probei de glucoză eliberată în urma hidrolizei enzimatică a celulozei Avicel PH101 regenerată catalizată de celulaza immobilizată prin entrapare în sol-gel (diluția probei 1:3)

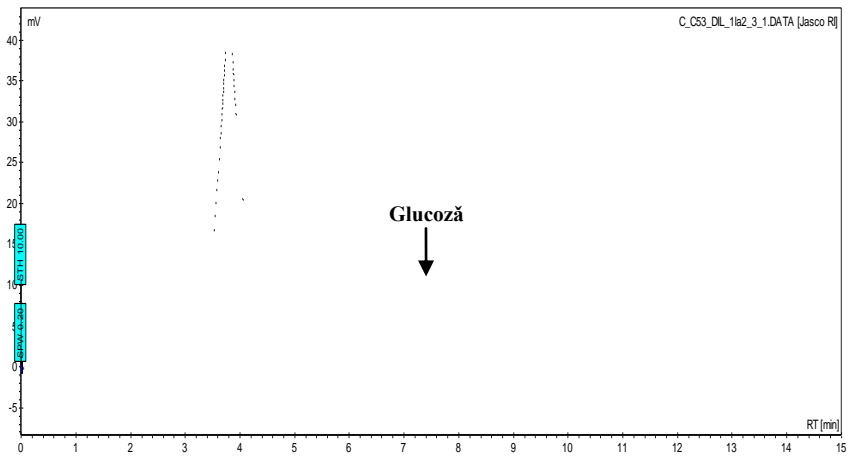


Figura 2. Cromatograma HPLC a probei de glucoză eliberată în urma hidrolizei enzimatică a celulozei microcristalină Avicel PH101 catalizată de celulaza immobilizată prin entrapare în sol-gel (diluția probei 1:2)

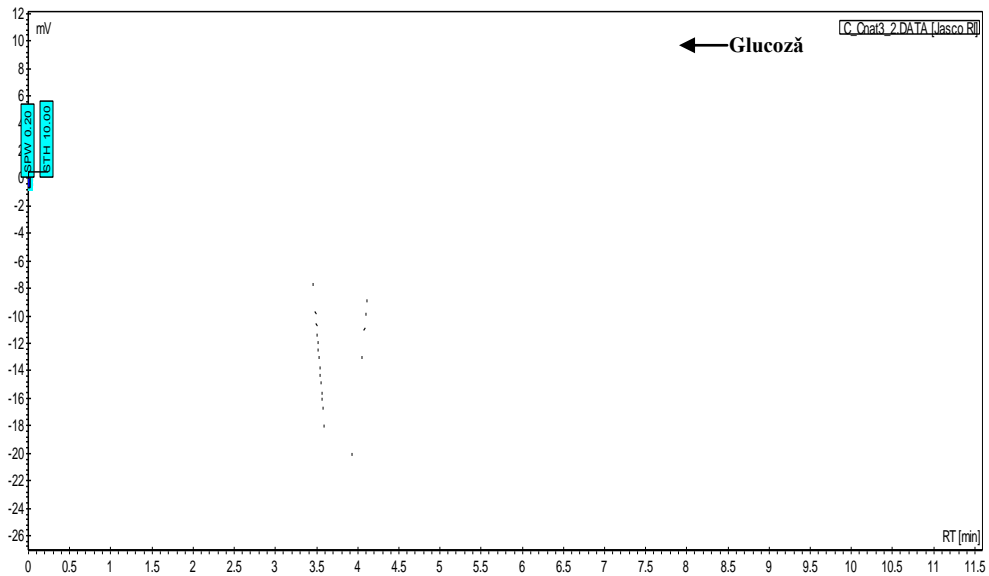


Figura 3. Cromatograma HPLC a probei de glucoză eliberată în urma hidrolizei enzimatică a celulozei Avicel PH101 regenerată catalizată de celulaza nativă (diluția probei 1:3)

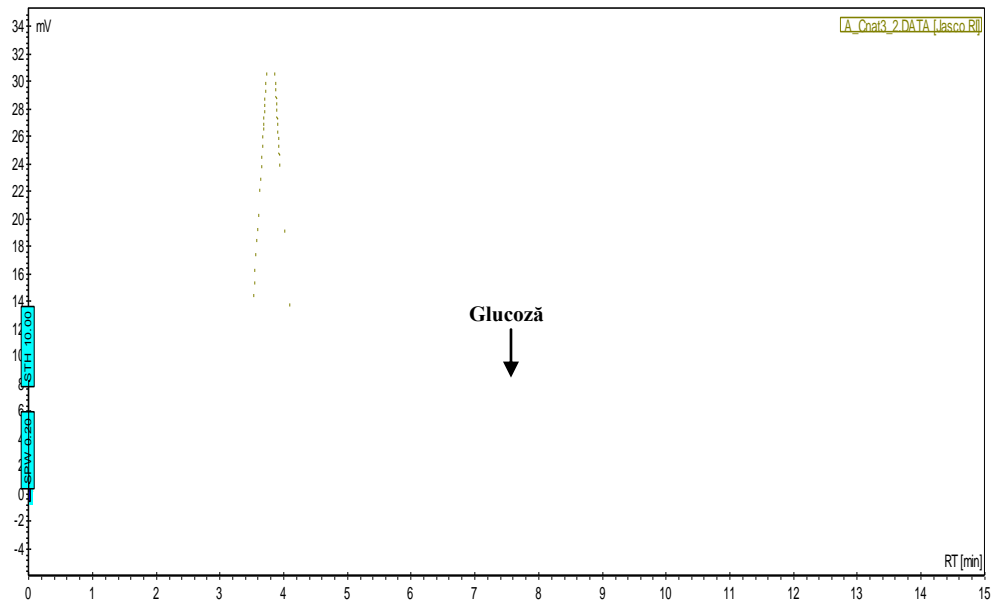


Figura 4. Cromatograma HPLC a probei de glucoză eliberată în urma hidrolizei enzimatică a celulozei microcristalină Avicel PH101 catalizată de celulaza nativă (diluția probei 1:2)

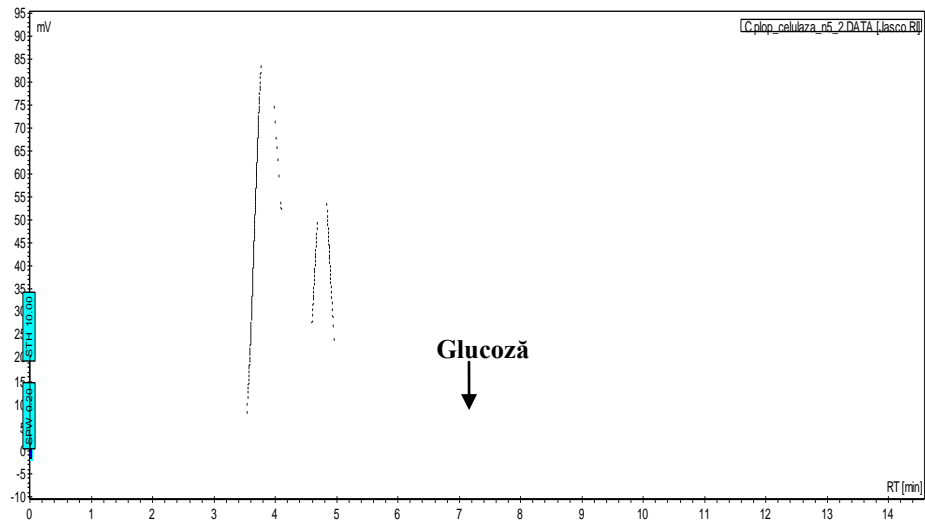


Figura 5. Cromatograma HPLC a probei de zahar eliberat în urma hidrolizei enzimatice a celulozei din plop catalizată de celuloza nativă (diluția probei 1:2)

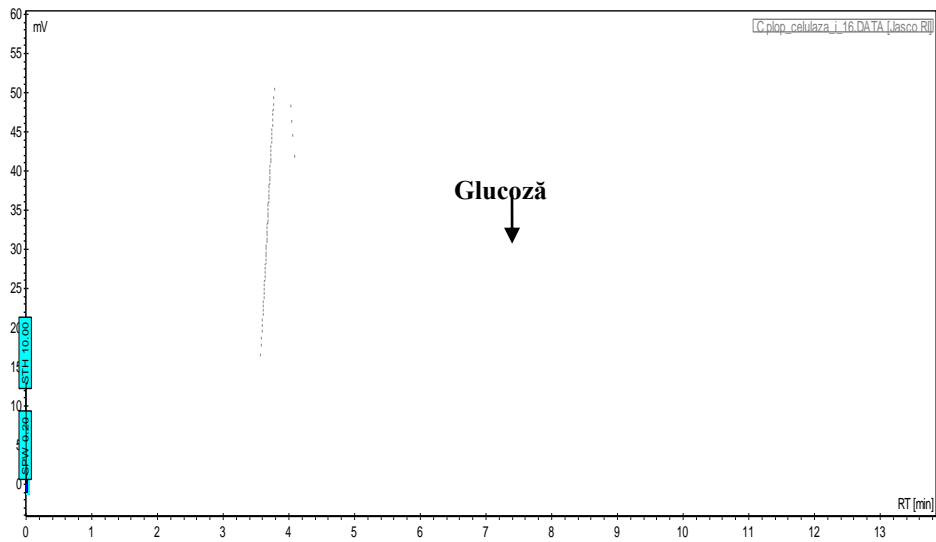


Figura 6. Cromatograma HPLC a probei de zahar eliberat în urma hidrolizei enzimatice a celulozei din plop catalizată de celuloza imobilizată prin entrapare în sol-gel (diluția probei 1:2)

LISTA DE LUCRĂRI

A. LUCRĂRI REZULTATE DIN CERCETĂRILE EFECTUATE ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

Articole publicate în reviste indexate în baza de date ISI Web of Science

1. **Ungurean M.**, Paul C., Peter F., Cellulase immobilized by sol-gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **2012**, DOI 10.1007/s00449-012-0835-9 (cifră de impact **1,809**).
2. Macarie C. A., Segneanu A.E., Balcu I., Pop R., Burtica G., **Ungurean M.**, Grozescu I., Use of alkaline lyophilization process for lignocellulosic biomass pretreatment, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **2012**, 7, 1577-1586 (cifră de impact **1,20**)
3. **M. Ungurean**, L. Gubicza, Zs. Csanádi and F. Peter, „An integrated system of ionic liquid pretreatment and enzymatic hydrolysis of wood biomass, using immobilized cellulase”, în curs de evaluare la *Chemistry central journal*, 2013(cifră de impact **3,25**).

Articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale

1. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Ursoiu A., Peter F., Ionic Liquids Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wood biomass, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 52, pp.387-391 (citată în SCOPUS).
2. Ivănoiu A., Schmidt A., Peter F., Rusnac L.M., **Ungurean M.**, Comparative Study on Biodiesel Synthesis from Different Vegetable Oils, *Chemical Bulletin of "Politehnica" University of Timisoara, România*, **2011**, 56, pp.94-99 (citată în Index Copernicus).

Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale

1. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Peter F., Ionic liquid pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic materials by native and immobilized cellulases, *5th International Congress on Biocatalysis*, Hamburg, Germania, **2010**, pg 264.
2. **Ungurean M.**, Fițigău F., Ursoiu A., Peter F., Paul C., Immobilization of the Cellulase by the Sol-gel Method, *Seventh International Conference on Renewable Resources and Biorefineries*, Bruges, Belgia, **2011**, pg 99.
3. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Ursoiu A., Peter F., Ionic Liquids Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wood biomass, *International Conference on Chemical Engineering and Technology*, Veneția, Italia, **2011**, pg.324.
4. Ursoiu A., **Ungurean M.**, Todea A., Corci L., Croitoru R., Paul C., Boeriu C., Peter F., Optimization of biocatalytic function of hydrolases entrapped in tailored sol-gel materials, „14th European Congress on Biotechnology”, Istanbul, Turcia, **2012**, pg. 66.

Lucrări prezentate la manifestări științifice naționale

1. **Ungurean M.**, Paul C., Balcu F., Macarie C., Peter F., Influence of ionic liquids on pretreatment on hydrolysis of lignocellulosic materials, *2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Timișoara, România, 2010*, pg 16.
2. **Ungurean M.**, Paul C., Fițigău F., Peter F., Tehnici noi în hidroliza materialelor lignocelulozice: pretratamentul cu lichide ionice și utilizarea enzimelor imobilizate, *The XXXI-st Romanian Chemistry Conference, Râmnicu-Vâlcea, România, 2010*, pg 56.
3. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Balcu F., Peter F., Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wood biomass, *The XIIth International Symposium "Young People and Multidisciplinary Research"*, Timișoara, România, **2010**, pg 13.
4. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Ursoiu A., Peter F., Comparison of different pretreatment methods of lignocellulosic biomass: delignification and enzymatic hydrolysis, *12th Edition of Timisoara's Academic Days, Timișoara, România, 2011*, pg 113.
5. **Ungurean M.**, Fițigău F., Paul C., Peter F., Non-conventional pretreatment and hydrolysis of cellulosic raw materials for bioethanol production, *The XIIIth International Symposium "Young People and Multidisciplinary Research"*, Timișoara, România, **2011**, pg 28.
6. **Ungurean M.**, Peter F., Enzymatic hydrolysis of cellulose catalyzed by immobilized cellulase, *The XIVth International Symposium "Young People and Multidisciplinary Research"*, Timișoara, România, **2012**, pg 24

B. ALTE LUCRĂRI

1. Ursoiu A., **Ungurean M.**, Paul C., Peter F., Optimization of 2-octanol kinetic resolution by selection of sol-gel immobilization precursors and reaction parameters, *14th International Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society, Rimini, Italia. Journal of Biotechnology*, **2010**, 150 (1), 388-389.
2. Ursoiu A., Paul C., Marcu C., **Ungurean M.**, Peter F., Double Immobilized Lipase for the Kinetic Resolution of Secondary Alcohols, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 52, pp.70-75, (citat în SCOPUS).
3. Ursoiu A., Paul C., Marcu C., **Ungurean M.**, Kurtan T., Zamfir A. D., Peter F., Kinetic resolution of secondary alcohols using immobilized lipase from *Candida Antarctica B*, *12th Edition of Timisoara's Academic Days, Timișoara, România, 2011*, pg 114.