

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

-Rezumat-

autor: ing. Mihaela UNGUREAN

Bioetanolul este unul dintre cei mai importanți biocombustibili studiați 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 deeurilor 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. 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 benefic 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, astfel crescând cantitatea de bioetanol, a fost necesară introducerea unei etape de pretratare a materialului lignocelulozic. Procedeu ideal de pretratare presupune creșterea reactivității celulozei, a randamentului de recuperare al pentozelor sau hexozelor, împiedicarea formării inhibitorilor și nu permite formarea de reziduuri solide. S-au dezvoltat o serie de metode fizice (mărunțire, măcinare), chimice (acid, alcalin), fizico-chimice (microunde, solvenți organici, lichide ionice) sau metode combinate de pretratare care au determinat valorificarea reziduurilor, delignifierea biomasei, scăderea cristalinității celulozei și îmbunătățirea randamentului de hidroliză.

Recent, lichidele ionice s-au investigat în pretratarea 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 pretratare astfel scăzând costurile de producție. Utilizarea

lichidelor ionice în amestec cu diferiți solvenți organici sau sururi determină creșterea capacității de dizolvare a celulozei și ligninei.

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

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 vederea îndeplinirii obiectivului urmărit, cercetările experimentale s-au cristalizat pe următoarele direcții:

- 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 imobilizarea celulazei prin tehnica entrapării în sol-gel
- Hidroliza enzimatică a celulozei microcristaline și celulozei din biomasă utilizând celulaza imobilizată
- Studiul cinetic al hidrolizei enzimatică a celulozei microcristaline Avicel PH101 catalizată de celulaza nativă și imobilizată
- Studiul reutilizării celulazei imobilizate prin entrapare în sol-gel

Teza de doctorat este structurată în patru capitole:

Primul capitol al tezei, Studiul de literatură, sintetizează informațiile din literatură în ceea ce privește 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.

În capitolul al II-lea sunt prezentate **Contribuțiile originale** ale tezei de doctorat. Prima parte al acestui capitol cuprinde pretratarea biomasei lignocelulozice prin diferite metode

simple și combinate de pretratare. Patru tipuri de lemn, două de tip lemn de esență moale (brad și salcâm) și două de tip lemn de esență tare (plop și stejar) s-au pretratată cu acid sulfuric diluat, glicerină pură sau reziduală, lichide ionice, acid sulfuric/[Emim]Ac și glicerină/[Emim]Ac. Biomasa pretrată a fost supusă hidrolizei enzimatică cu celuloza Celluclast 1.5L. S-a studiat influența metodelor de pretratare asupra eficienței hidrolizei enzimatică a celulozei din biomasă.

În urma pretrării salcâmului, plopului și stejarului cu acid sulfuric diluat, cantitatea de zahăr eliberat a crescut pe tot parcursul reacției de hidroliză enzimatică, comparativ cu biomasa netratată. Aceasta probabil se datorează faptului că accesibilitatea enzimei la celuloza din biomasă a fost îmbunătățită după pretratare, deoarece în urma pretratamentului cu acid sulfuric s-a hidrolizat parțial hemiceluloza. O cantitate mai mare de hemiceluloză a fost hidrolizată 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 obținut în urma hidrolizei enzimatică a celulozei din bradul pretratată a fost mai mică decât cantitatea de zahăr eliberat din bradul netratat, aceasta probabil deoarece în urma pretratamentului acid s-a hidrolizat o parte din celuloza. 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.

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 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 pretratamentul cu glicerină pură a dus la un randament de hidroliză de 63,8% după 6 ore, comparativ cu 50,2% în cazul glicerinei reziduale. 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. Prin urmare, utilizarea glicerinei reziduale de la fabricarea biodieselului nu afectează productivitatea complexului enzimatic celulozolitici ci doar viteza reacției de hidroliză, iar această influență depinde de proveniența biomasei. Aproximativ 32%, respectiv 29% lignin s-a dizolvat în glicerină din lemnul de esență moale, comparativ cu 21%, respectiv 25% lignin dizolvat în glicerină din lemnul de esență tare (stejar, respectiv plop).

Comparativ cu biomasa netratată, pretratarea celor patru tipuri de rumeguș cu glicerină pură sau reziduală a determinat creșterea eficienței de hidroliză enzimatică a celulozei din biomasă, aceasta deoarece glicerina este capabilă să îndepărteze o parte de lignin din

biomas , astfel accesul celulozei la substrat fiind mbun t it. In urma pretrat rii biomasei cu glicerin pur , dup 6 ore de reac ie, randamentul de hidroliz a crescut cu aproximativ 31% pentru rumegu ul de salcâm i plop, 28% pentru rumegu ul de salcâm, respectiv 10% pentru rumegu ul de brad. In urma pretrat rii cu glicerin rezidual , randamentul de hidroliz a fost îmbunat it cu aproximativ 20% pentru stejar, 30% pentru rumegu ul de plop, 17% pentru salcâm, respectiv 5% pentru rumegu ul de brad.

In ultimii ani, lichidele ionice au atras interesul utiliz rii lor în diverse domenii datorit propriet ilor acestora, printre care stabilitate termic , stabilitate chimic i capacitatea de a dizolva diferi i solven i organici sau anorganici. Datorit capacit ii unor lichide ionice de a dizolva celuloza i lignina din biomas , acestea s-au folosit i la pretratarea biomasei lignocelulozice. Lichidele ionice care s-au folosit pentru pretratarea biomasei 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) i acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]Ac). Lichidele ionice ce con in anionii [BF₄]⁻, [PF₆]⁻ au fost ineficiente în pretratarea biomasei, cantit ile de zaharuri ob inute pe tot parcursul reac iei, în urma hidrolizei enzimatice a acestor tipuri de biomas pretratat fiind aproximativ acelea i, sau chiar mai mici (în cazul stejarului i salcâmului) decât cantit ile de zaharuri ob inute dup hidroliza biomasei netratate. Cel mai eficient lichid ionic folosit pentru pretratarea biomasei lignocelulozice a fost [Emim]Ac. In urma hidrolizei enzimatice a biomasei pretratate cu [Emim]Ac, randamentul de hidroliz , calculat dup 4 ore de reac ie, a crescut cu aproximativ 10% pentru brad, 20% pentru salcâm i stejar, respectiv 40% pentru plop, comparativ cu biomasa netratat . Dintre cele patru tipuri de biomas pretratate cu [Emim]Ac, plopul pretratat a fost hidrolizat cu eficien a cea mai mare, probabil deoarece acesta are cel mai mic con inut de lignin , iar enzima are tendin a de a se adsorbi pe lignin i în acest fel î i pierde par ial activitatea. Lichidul ionic [Emim]Ac a fost capabil s dizolve, dup 24 ore, aproximativ 48% lignin din rumegu ul de salcâm, i 21% lignin din brad, de tip lemn de esen moale. Lichidul ionic ce con ine anionul trifluoroacetat a dizolvat aproximativ 30% lignin din salcâm, respectiv 19% lignin din brad. Aproximativ 35% lignin din lemnul de esen tare (plop i stejar) s-a dizolvat dup 24 ore, în lichidul ionic [Emim]Ac, comparativ cu [Emim]TFA care a dizolvat aproximativ 23% din rumegu ul de stejar, respectiv 29% din rumegu ul de plop.

Pentru îmbun t irea eficien ei de hidroliz a polizaharidelor din biomasa lignocelulozic , cele patru tipuri de rumegu studiate s-au pretratate atât cu acid sulfuric diluat cât i cu lichidul ionic [Emim]Ac. S-a recurs la acest metod de pretratare deoarece are loc

creșterea cantității de zaharuri fermentescibile din hemiceluloză (în special xiloza) datorită capacității acidului sulfuric diluat de a hidroliza parțial hemiceluloza din rumeguș, și a cantității de zaharuri eliberate în urma hidrolizei celulozei din biomasă datorită capacității lichidului ionic care conține anionul acetat de a îmbunătăți accesul celulozei la substrat prin scăderea gradului de cristalinitate a celulozei din biomasă și îndepărtarea ligninei. 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. În urma hidrolizei enzimatice a celulozei din biomasa 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 biomasa pretrată cu lichid ionic.

Metoda combinată de pretratare cu glicerol/[Emim]Ac permite îndepărtarea unei cantități mai mari de lignin din biomasă, prin urmare crește accesibilitatea enzimei la celuloză. Pretratarea biomasei lignocelulozice prin metoda combinată cu glicerol/lichid ionic a fost mai eficientă pentru hidroliza enzimatică a celulozei din biomasă, decât pretratarea simplă cu glicerol, respectiv lichid ionic. În urma hidrolizei enzimatice a celulozei din biomasa pretrată prin metoda combinată cu glicerol/lichid ionic, randamentul de hidroliză, calculat după 4 ore de reacție, a crescut cu aproximativ 6% pentru brad, 10% pentru salcâm, respectiv 8% pentru plop și 25% pentru stejar, comparativ cu randamentele de hidroliză obținute în urma hidrolizei celulozei din biomasa pretrată cu lichid ionic.

Pentru a reduce costurile energetice, costurile de proces și pentru a preveni degradarea celulozei, în cazul pretrării 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. S-a ales ca dizolvarea biomasei să se realizeze în DMSO/[Emim]Ac în raport 50:50 (% vol) la 90°C, timp de 6 ore. Pentru a putea rumegușul de plop să-a pretrată cu acid sulfuric diluat pentru o mai bună dizolvare a biomasei în DMSO/[Emim]Ac, respectiv, pentru creșterea cantității de zaharuri fermentescibile, atât din hemiceluloză (datorită capacității acidului de a hidroliza hemiceluloza din biomasă la zaharuri fermentescibile, în special xiloza) cât și a cantității de zaharuri rezultate în urma hidrolizei enzimatice a celulozei recuperate din solvent (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% lignin au fost dizolvate din rumegușul de plop pretrată. 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% lignin din amestecul standard, respectiv 29% celuloză și 3% lignin din plopul pretratat. S-a precipitat o cantitate mai mare de lignin 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 modificări structurale însemnate în timpul proceselor de dizolvare în amestecul DMSO/[Emim]Ac urmat 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.

A doua parte al acestui capitol cuprinde imobilizarea celulozei 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 aplicat unui domeniu larg de enzime, stabilitate termică și chimică ridicată, flexibilitatea dimensiunii și geometriei porilor, se poate imobiliza o cantitate mare de proteină. Au fost evaluate preparate imobilizate obținute prin două metode de entrapare cu diferiți aditivi și silani precursori. Evaluarea s-a realizat prin determinarea randamentului de imobilizare, activității catalitice și randamentului de regenerare 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 microcristaline a fost folosit în studiile de stabilitate și reutilizare.

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. Activitatea catalitică a celulozei entrapate a crescut până la un raport al silanilor precursori MeTMOS/TMOS de 3:1 și la o încărcare cu enzimă de 44,46 mg enzimă /g preparat, după care valoarea activității s-a menținut aproximativ constantă.

Performanțele catalitice ale preparatelor enzimatic obținute în urma imobilizării prin tehnica sol-gel au fost studiate în reacția de hidroliză enzimatică a celulozei microcristaline Avicel PH101, pentru a găsi un preparat celulozic capabil să hidrolizeze celuloza, iar în urma imobilizării performanțele catalitice și stabilitatea celulozei să fie îmbunătățite. 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 hidroliză enzimatică a celulozei, comparativ cu celelalte preparate obținute prin metoda I de imobilizare și care folosesc amestecuri de doi silani precursori MeTMOS, respectiv TMOS și aditivii PEG sau TWEEN80. Toate preparatele în care s-a folosit la imobilizare surfactantul TWEEN80 ca aditiv, au determinat creșterea randamentului de hidroliză a celulozei. 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.

Studiile de stabilitate ale celulozei, în condițiile studiate, au demonstrat că după imobilizare, celuloza 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, celuloza 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, s-a demonstrat că acestea inactivează complexul celulozic, de aceea lichidele ionice nu se pot folosi ca mediu de reacție în hidroliză enzimatică a celulozei, ci doar la pretratarea sau dizolvarea biomasei lignocelulozice. Pentru a observa distribuția celulozei în interiorul matricei de sol-gel formate s-a folosit microscopia cu fluorescență. Din imaginile prin spectroscopia cu fluorescență s-a observat distribuția celulozei în toată matricea de sol-gel.

Următorul capitol cuprinde hidroliza enzimatică a celulozei microcristaline Avicel PH101, celulozei regenerate Avicel, după dizolvarea amestecului standard în soluția de DMSO/[Emim]Ac și celulozei din plop utilizând celulaza immobilizată prin entrapare în sol-gel. S-a folosit celulaza immobilizată 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.

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 immobilizată, 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 enzimatice a celulozei regenerate, 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 celulaza immobilizată, randamentul de reacție calculat după 8 ore în urma hidrolizei celulozei regenerate, a fost de aproximativ 84%, respectiv 46% în urma hidrolizei enzimatice a celulozei Avicel microcristaline.

Randamentele de hidroliză calculate pe tot parcursul reacției, când s-a folosit ca substrat celuloza microcristalină sau celuloza regenerată, au fost mai mici pentru reacția catalizată de celulaza immobilizată, comparativ cu celulaza nativă. Acest lucru se poate justifica prin faptul că după immobilizare apare fenomenul de difuzie îngreunată, cât și datorită faptului că la hidroliza enzimatică a celulozei s-a introdus cu aproximativ 40% mai mult enzim nativ (0,62 mg protein/ml), comparativ cu cantitatea de enzim din preparatul celulazic (0,44 mg protein/ml). În schimb celulaza immobilizată prezintă o serie de alte avantaje importante cum ar fi stabilitate ridicată și posibilitatea de reutilizare.

Deși cantitatea de proteină din preparatul celulazic a fost mai mică decât din celulaza nativă, nu s-au observat diferențe mari, pe tot parcursul reacției, între randamentele de reacție ale celulozei regenerate catalizate de enzima nativă și immobilizată. Randamentele de hidroliză calculate pe tot parcursul reacției, când s-a folosit ca substrat celuloza regenerată, au fost cu aproximativ 10% mai mici pentru reacția catalizată de celulaza immobilizată, comparativ cu celulaza nativă. De exemplu, când reacția a fost catalizată de celulaza immobilizată, randamentul de reacție după 24 ore a fost de aproximativ 84%, iar când reacția a fost catalizată de celulaza

nativ a fost de 95%. Dizolvarea celulozei în soluția de DMSO/[Emim]Ac și regenerarea ei a fost benefic 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.

Celuloza din plop obținută în urma dizolvării biomasei în DMSO/[Emim]Ac s-a hidrolizat enzimatic utilizând celulaza nativă și imobilizată. Cantitatea de zaharuri eliberată în urma hidrolizei celulozei din plop a crescut pe tot intervalul de timp studiat (Figura II.27). După 24 ore de reacție, randamentul de hidroliză obținut în urma hidrolizei celulozei din plop catalizată de celulaza nativă și celulaza imobilizată a fost de aproximativ 70%, respectiv 50%.

Cantitatea de glucoză eliberată în urma hidrolizei enzimatice a celulozei regenerate (din amestecul standard și din plop) și celulozei microcristaline Avicel s-a analizat și prin cromatografia de lichide.

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 celulaza nativă și celulaza imobilizată. Pentru determinarea parametrilor cinetici s-a utilizat modelul clasic Michaelis-Menten. Parametrii cinetici ai reacției de hidroliză enzimatică au fost calculați cu ajutorul programului Sigma Plot (Systat Software Inc.).

Entraparea celulozei în matrici siliconice a determinat o scădere a constantei Michaelis-Menten (K_m) de la 127,6 mM la 58,8 mM. În același timp, viteza maximă scăzut de 3,46 ori după imobilizare (de la 18,6 mM h⁻¹ la 5,4 mM h⁻¹). 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 catalizate enzimatic pentru celulaza imobilizată, exprimat prin raportul k_{cat}/K_m , a fost de 8.8 mM⁻¹h⁻¹, observându-se o mică scădere a eficienței catalitice comparativ cu celulaza nativă pentru care k_{cat}/K_m a fost de 9.9 mM⁻¹h⁻¹. Aceasta se datorează creșterii rezistenței la transferul de masă în urma fenomenului de difuzie îngreunată, frecvent întâlnit după imobilizarea enzimei. Chiar dacă celulaza imobilizată a prezentat o eficiență catalitică mai mică decât celulaza nativă, entraparea enzimei prezintă o serie de avantaje cum ar fi stabilitate ridicată și posibilitatea de reutilizare.

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. 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 (netratat) și celuloza Avicel PH101 regenerat din soluția de DMSO/[Emim]Ac (pretratată).

Se observă că celuloza imobilizată are o capacitate mai bună de a hidroliza celuloza Avicel PH101 regenerat din DMSO/[Emim]Ac (pretratată), deoarece după dizolvarea celulozei în soluția de dimetilsulfoxid/lichid ionic, celuloza regenerată prezintă un grad de cristalinitate mai scăzut, de aceea accesul celulozei la substrat a fost îmbunătățit. De menționat este faptul că, deși activitatea celulozei imobilizate, utilizând ca substrat celuloza pretrată, 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 pretrată.

Activitatea celulozei imobilizate (calculată după 8 ore), la primul ciclu de reutilizare, pe substrat de celuloză pretrată 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 nou ori atunci când s-a folosit ca substrat celuloza pretrată, 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 scaderii în timp a stabilității în soluție apoasă. După a cincea reutilizare, activitatea catalitică a celulozei imobilizate, testată 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 pretrată a fost de aproximativ 37% din activitatea inițială, iar când s-a folosit celuloza netratată a fost de 13%. Se preferă ca celuloza imobilizată să se reutilizeze pe substrat de celuloză pretrată cu DMSO/[Emim]Ac deoarece se cunosc o serie de avantaje: celuloza pretrată prezintă un grad de cristalinitate mai scăzut, astfel se îmbunătățește accesul enzimei la substrat, creșterea numărului de reutilizări ale preparatului celulazic și cantitatea de zaharuri fermentescibile, se reduce timpul de hidroliză, respectiv deoarece soluția de DMSO/[Emim]Ac se poate reutiliza ușor, celuloza a fost pretrată cu DMSO/[Emim]Ac recuperată, prin urmare scădând costurile economice.

Capitolul al III-lea, **Partea experimentală**, detaliază materialele utilizate pe parcursul experimentelor, metodele de sinteză și analiză folosite.

Ultimul capitol, cuprinde **Concluziile finale**, rezultate din studiile experimentale în conformitate cu obiectivele stabilite, evidențiind contribuțiile originale ale tezei.

Rezultatele obținute la elaborarea tezei de doctorat indică faptul că în urma pretratământului biomasei lignocelulozice prin metodele simple sau combinate de pretratare studiate a crescut randamentul de hidroliză al celulozei din biomasa pretrată, pretratarea biomasei prin metodele combinate cu acid diluat/lichid ionic, respectiv glicerol/lichid ionic a fost mai eficientă decât pretratarea biomasei prin metodele simple cu acid sulfuric diluat, glicerol și lichid ionic. Pretratarea inițială a biomasei cu acid sulfuric diluat, urmată de pretratarea cu DMSO/[Emim]Ac și optimizarea parametrilor de pretratare a fost benefică pentru dizolvarea biomasei lignocelulozice deoarece are loc o mai bună dizolvare a biomasei în DMSO/[Emim]Ac, respectiv, creșterea cantității de zaharuri fermentescibile, atât din hemiceluloză (datorită capacității acidului de a hidroliza hemiceluloza din biomasa la zaharuri fermentescibile, în special xiloză) cât și din celuloză, solventul dimetilsulfoxid scade vâscozitatea lichidului ionic, acest lucru permițând o agitare mai bună, scăderea costurilor procesului, posibilitatea de separare ușoară a materialului lignocelulozic nedizolvat, posibilitatea de reutilizare ușoară a amestecului, creșterea cantității de zaharuri fermentescibile și a cantității de bioetanol. Imobilizarea celulozei prin tehnica entraperii în sol-gel a dus la îmbunătățirea performanțelor catalitice ale celulozei, celuloza imobilizată fiind mai stabilă decât enzima nativă, în condițiile studiate. Reutilizarea celulozei imobilizate prin entraperie în sol-gel, în mai multe cicluri de reacție atât pe celuloză microcristalină Avicel PH101, cât și pe celuloză regenerată Avicel PH101 după dizolvarea amestecului standard în DMSO/[Emim]Ac a dus la creșterea cantității de zaharuri fermentescibile. 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 pretrată prezintă un grad de cristalinitate mai scăzut, astfel se îmbunătățește accesul enzimei la substrat, creșterea numărului 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 pretratăată cu DMSO/[Emim]Ac recuperată, prin urmare scăderea costurilor economice.

Rezultatele originale ale cercetărilor experimentale prezentate în teză au fost concretizate prin elaborarea unor lucrări, dintre care 2 lucrări publicate în reviste cotate ISI; 1 lucrare în curs de acceptare într-o revistă cotată ISI, 2 lucrări publicate într-o revistă, cat. B+; 10 lucrări comunicate la conferințe interne internaționale, din care 4 înstrăinate.

