



ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI

060031 București, Splaiul Independenței nr. 296, C.P. 56-53, Tel. 021. 221.92.02, Fax 021. 221.90.71; e-mail: biologie@ibiol.ro

Se aprobă,
Director,
Dr. Dumitru T. Murariu
m.c. al Academiei Romane

Raport științific și tehnic al etapei 4 – 2017 - în cadrul proiectului

**Biocatalizator cooperativ-dual pentru biorafinărie – oportunități și provocări pentru
conversia glicerolului rezidual la produși valoroși în industria polimerilor**

<http://www.ibiol.ro/proiecte/PNII/BioGlyCat/index.htm>

Parteneri implicați în etapa 4:

- Institutul de Biologie București al Academiei Române – coordonator
- Universitatea București – Facultatea de Chimie – partener 1
- S.C. Institutul de Cercetări Produse Auxiliare Organice S.A., Mediaș – partener 2

Sef Departament/Director proiect,
dr.Mădălin Enache

Biocatalizatori – Testarea în sistem – Aplicația industrială – Management, diseminare și exploatare rezultate – Partea II

Rezultate așteptate (conform Planului de realizare – anexa la contract):

- Portofoliu glicerol rezidual, schema de flux și bilanț de materiale
- Instalație pilot
- Tehnologie de sinteză pentru poliglicerol
- GlyC, GlyD și poligliceroli
- Raporturi ale meeting-urilor și Raporturi științifice
- Articole sau patente
- Site dedicat BioGlyCat, Vizite de lucru

Rezultate obținute:

- Portofoliu glicerol rezidual, scheme de flux și bilanț de materiale
- Instalație pilot
- Tehnologie de sinteză pentru poliglicerol
- GlyC, GlyD și poligliceroli
- Raporturi ale meeting-urilor și Raporturi științifice
- Articole sau patente
- Site dedicat BioGlyCat
- Vizite de lucru
- 2 lucrări ISI în subiect comun cu al proiectului
- Participarea la 6 conferințe științifice de specialitate (5 prezentări orale și 4 postere)

Activitatea consorțiului în cursul etapei IV (2017) a proiectului BioGlyCat s-a desfășurat în cadrul a 9 activități experimentale generice (trei aferente CO, una aferentă P1, două aferente P2 și trei în care au fost implicați membrii consorțiului) care au permis optimizarea funcționării unui sistem biocatalitic bazat pe biocatalizator dual, pentru convertirea glicerolului rezidual în glicerol carbonat (GliC) și glicidol (GliD). Rezultatele experimentale, cât și interpretarea acestora sunt detaliate în cadrul prezentului raport.

Obiectivele proiectului pentru această etapă au fost îndeplinite integral iar *diseminarea rezultatelor* obținute s-a realizat prin elaborarea a două articole științifice de specialitate publicate/acceptate în reviste ISI. De asemenea, membrii consorțiului au participat la conferințe științifice de specialitate unde au fost susținute nouă lucrări (5 prezentări orale și 4 postere). Conferințele au fost organizate în Italia, Franța, Polonia, Spania și România.

Descrierea rezultatelor principale aferente Etapei 4

Purificarea și caracterizarea biochimică a lizin-decarboxilazei sintetizată de tulpina de bacterie halotolerantă LN1-17

În urma studiului calitativ, prin care s-a urmărit identificarea unor tulpini de bacterii halofile/halotolerante de a sintetiza lizin-decarboxilaze, a fost selectată tulpina LN1-17 pentru obținerea unui preparat enzimatic purificat și stabilirea parametrilor optimi de activitate catalitică.

Într-o primă etapă, s-a încercat stimularea producerii lizin-decarboxilazei de către tulpina de bacterie halotolerantă. S-au folosit trei variante de mediu de cultură pentru biosinteza enzimei. Astfel, prima variantă a mediului de cultură (GSM) a fost pregătită pornind de la 3 soluții stoc: soluția A a conținut 4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 5g KH_2PO_4 , ce s-au dizolvat în 100 mL apă distilată; soluția B a conținut 10g NH_4Cl , 5g NaCl , 4.1g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, în 100 mL apă distilată; soluția C, formată din 8g glucoză, 4 g lizină și 8g hidrolizat de cazeină (acizi casamino), dizolvați în 315 mL de apă distilată. Soluțiile A și B au fost sterilizate prin autoclavare la 121°C , timp de 20 minute, iar soluția C a fost sterilizată prin filtrare pe membrană Millipore, cu dimensiunea porilor de 0.22 μm . 20 mL din soluția A au fost amestecați aseptice cu 1.1 mL soluție B și 78,9 mL soluție C (Wanda Lu et al., 1970). S-a realizat, de asemenea, și un control negativ, format din cele trei soluții stoc, fără a adăuga mediului de cultură hidrolizat de cazeină, care ar contribui la stimularea sintezei de enzimă. Cea de-a doua variantă a mediului de cultură a conținut (g/L): yeast extract 10, NaCl 100, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 7, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 6, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.36, KCl 2, NaHCO_3 0.06, NaBr 0.026 (mediu MH, Ventosa și colab., 1972), suplimentat cu 1% lizină și 2.5% acizi casamino. Varianta a treia a mediului de cultură a fost reprezentată de mediu MH, suplimentat cu 1 % lizină. Pentru aceste variante de mediu, s-a folosit un volum de 10 mL inocul bacterian, a cărui densitate optică, la 660 nm, a fost de 0.4. Dezvoltarea bacteriană s-a realizat la temperatura de 30°C , 140 rpm. După 24 h, tulpina s-a dezvoltat pe toate mediile de cultură, cu excepția controlului negativ al primei variante a mediului de cultură. S-a urmărit activitatea decarboxilazică după 24h și 72h de la incubarea tulpinii în mediile de cultură testate.

Activitatea decarboxilazică s-a determinat prin metoda Lenhoff (1982). Fiecare tub de test a conținut: 20 μL extract enzimatic, 256 μL tampon fosfat 10 mM, pH 7 și 24 μL soluție lizină 100 mM. Amestecul a fost incubat timp de 30 minute, la 30°C . Reacția a fost stopată cu 300 μL K_2CO_3 , timp de 5 minute, la 30°C . După această etapă, s-au adăugat 300 μL acid 2,4,6-trinitrobenzen sulfonic (TNBS) 20 mM. Produsul de reacție obținut (cadaverina) a fost extras cu 600 μL toluen. S-a vortexat amestecul timp de 1min, iar produsul final s-a separat în două faze: o fază apoasă portocalie și o fază organică, de la incoloră la galben. S-au preluat 200 μL din stratul organic și s-a determinat absorbanta la 340 nm, față de toluen. Cantitatea de cadaverină care se

eliberează per unitatea de timp, determinată la 340 nm, reprezintă o măsură a activității lizin-decarboxilazei. Activitatea catalitică s-a exprimat ca $\mu\text{moli/min/mL}$.

Tabel 1. Activitatea decarboxilazică a tulpinii LN1-17 după 24h și 72h de creștere pe diferite medii de cultură

Variantă mediu de cultură Activitatea decarboxilazică ($\mu\text{moli/min/mL}$)	I (GSM24 h)	I (GSM48 h)	II (24h)	II (72h)	III (24h)	III (72h)
LN1-17	0.0043	0.0038	0.012	0.0076	0.0085	0.0058

I (GSM) - mediu cu glucoză, săruri, lizină și acizi casamino

II – mediu MH, cu adaos de lizină și acizi casamino

III- mediu MH, cu adaos de lizină

Datele obținute au arătat faptul că activitatea decarboxilazică maximă s-a obținut după 24 h de la inocularea în cea de-a doua variantă a mediului de cultură (mediu MH, cu adaos de lizină și acizi casamino).

Astfel, pentru realizarea următoarelor etape de biosinteză enzimatică, de purificare și caracterizare biochimică a lizin-decarboxilazei, a fost utilizat mediul de cultură MH, suplimentat cu 1% lizină și 2.5% acizi casamino.

Purificarea enzimei

După dezvoltarea culturii bacteriene și biosinteza enzimei, lichidul de cultură a fost centrifugat la 9500 g, timp de 10 de minute, la 4°C. Supernatantul s-a îndepărtat, iar biomasa s-a păstrat la -80°C, până la realizarea următoarei etape. Celulele s-au tratat cu 40 mL soluție 0.9% NaCl și s-au centrifugat. Celulele astfel spălate s-au suspendat în 30 mL tampon fosfat 0.02M, pH 7. 10 mL din această suspensie s-au preluat și sonicat (15 reprize/5sec). Amestecul rezultat s-a centrifugat la 4°C, timp de 20 minute, 4000g, pentru îndepărtarea debriurilor celulare. Supernatantul obținut a fost considerat extract enzimatic brut. Un volum de 10 mL a fost supus unei purificări parțiale prin precipitare cu acetonă 80%. Această etapă de purificare s-a realizat la temperaturi negative (-5°C), raportul acetonă: extract enzimatic fiind de 2:1 (V/V). Acetona s-a adăugat treptat, sub agitare continuă, având grijă ca temperatura să nu depășească -2°C, după care s-a lăsat la frigider, timp de 24h. Precipitatul obținut s-a separat prin centrifugare la 4°C, 9500 rpm, 20 minute. Pudra acetonică obținută s-a păstrat și uscat la temperatura camerei timp de 60 minute, fiind apoi suspendată într-un volum de 10 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Extractul proteic obținut, a fost purificat prin gel filtrare, în porțiuni de câte 1 mL. Protocolul de lucru a impus, într-o primă etapă, pregătirea coloanei de gel filtrare, prin spălarea acesteia în prealabil cu apă milliQ și etanol 96%, și încărcarea acesteia cu 2 mL de gel obținuți prin

hidratarea a 2g de copolimer BioGel P-Biorad P100 cu 50 mL apă milliQ, timp de 12h, la 20°C. Echilibrarea s-a realizat cu soluție tampon Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, ce conține EDTA 0.003M și β -mercaptoetanol 0.001M. Eluția s-a realizat cu Tris-HCl 0.1M, 0.2M, 0.5M și 1M, pH 7.5, în trei repetiții pentru fiecare concentrație. S-a determinat în fiecare etapă concentrația proteică prin metoda Lowry și activitatea enzimatică, prin metoda descrisă de Lenhoff, cu unele modificări. Activitatea decarboxilazică s-a exprimat ca $\mu\text{moli/min/mg}$ proteină.

Tabel 2. Etapele purificării lizin-decarboxilazei sintetizată de tulpina de bacterie halotolerantă LN1-17

Nr. crt	Etapa de purificare	Volum (mL)	Concentrație proteică (mg/mL)	Activitate specifică ($\mu\text{moli/min/mg}$)
1	Filtrat de cultură	100	13.5	0.0005
2	Precipitare acetonă 80%	10	6.69	0.0008
3	Gel filtrare	1	0.27	0.034

Preparatul enzimatic parțial purificat a fost caracterizat biochimic, prin determinarea parametrilor fizico-chimici optimi de activitate catalitică.

Caracterizarea biochimică a preparatului enzimatic purificat

▪ Influența pH-ului asupra activității lizin decarboxilazei

S-a determinat activitatea decarboxilazică a extractului purificat, în medii de reacție cu valori de pH cuprins între 4-10, celelalte condiții de incubare rămânând constante (30°C, 0% NaCl, lizină 100 mM). După cum rezultă din tabelul 3, decarboxilaza parțial purificată a prezentat activitate catalitică la valori de pH cuprinse între 4-10, cu un maxim la valoarea de pH 7.

Tabel 3. Activitatea decarboxilazică a extractului proteic purificat, la diferite valori de pH ($\mu\text{moli/min/mL}$)

pH Tulpina	4	5	6	7	8	9	10
LN1-17	0.0056	0.0051	0.0053	0.0138	0.006	0.006	0.0058

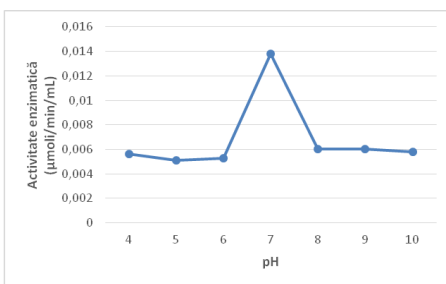


Fig. 1. Influența pH-ului asupra activității catalitice

▪ ***Influența temperaturii asupra activității catalitice***

În scopul stabilirii temperaturii optime de reacție a extractului proteic purificat, acesta a fost incubat la diferite valori de temperatură cuprinse între 4-60°C, celelalte condiții de incubare rămânând constante (pH 7, 0% NaCl, 100 mM lizină).

S-a constatat prezența activității catalitice în intervalul de temperatură 4-60°C, valoarea optimă de activitate fiind observată la 60°C.

Tabel 4. Activitatea decarboxilazică a extractului purificat la diferite valori de temperatură (μmol/min/mL)

Temperatura (°C) Tulpina	4	20	30	40	50	60
LN1-17	0.008	0.007	0.009	0.007	0.007	0.013

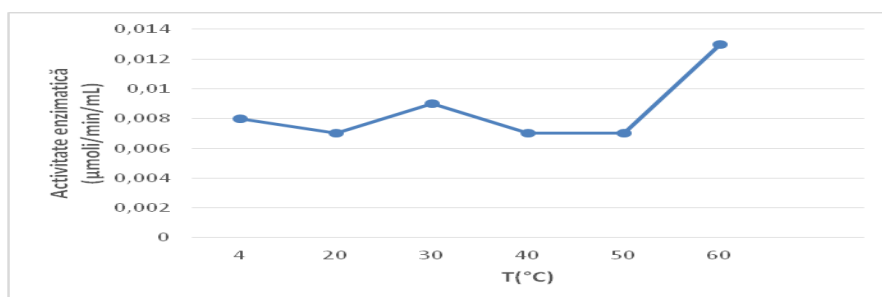


Fig. 2. Influența temperaturii asupra activității catalitice

▪ ***Influența concentrației de NaCl asupra activității catalitice***

În scopul determinării concentrației optime de NaCl pentru activitatea catalitică a preparatului proteic, s-a variat concentrația de sare în mediul de reacție de la 0 la 3 M NaCl.

S-a constatat că decarboxilaza sintetizată de tulpina LN1-17 a prezentat activitate catalitică la valori ale concentrației de NaCl de 0-3 M , activitatea fiind maximă la

concentrația de 0M NaCl, ceea ce confirmă caracterul halotolerant al enzimei, care se corelează cu creșterea tulpinii bacteriene.

Tabel 5. Activitatea decarboxilazică a extractului purificat, la diferite concentrații de NaCl ($\mu\text{moli/min/mL}$)

Concentrație NaCl (M) Tulpina	0	1	2	3
LN1-17	0.005	0.0043	0.0045	0.0035

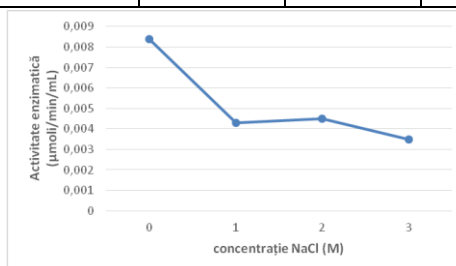


Fig.3. Influența concentrației de NaCl asupra activității lizin-decarboxilazei

Caracteristici fizice ale substantelor care intervin în procesul catalitic privind optimizarea funcționării unui sistem biocatalitic bazat pe biocatalizator dual, pentru convertirea glicerolului rezidual în glicerol carbonat (GliC) și glicidol (GliD)

În afara tulpinilor de microorganisme producătoare ale enzimelor de interes (lipaza și decarboxilază) în tehnologia elaborată intra următorii constituenți chimici pentru mediul de cultura: extract de levuri, proteos-peptonă, glucoza, NaCl, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KCl, NaHCO_3 , NaBr, BioGel P-Biorad P 100, TrisHCl, EDTA, β -Mercaptoetanol, metanol, apa, dimetilcarbonat, glicerina, glicidol, enzima lipaza din *Candida antartica*, particule magnetice-ELMP, lichide ionice, agregate enzimatic, tampon MES, acetona, 1-butyl-3-tetrafluoroborat [BMIM][BF₄], 1-butyl-3-metilimidazolcloridă[BIMIM][Cl], glutaraldehida, tetrahidrofuran, carbonat de glicerina. Pentru desfășurarea procesului la scară pilot în condiții optime astfel încât reacțiile chimice aferente etapelor procesului biocatalitic să nu fie afectate *este obligatorie cunoașterea* principalelor caracteristici fizico-chimice și date de identificare în vederea exploatarei optime a instalației, astfel:

Extract de drojdie

CAS: 8013-01-2

-ingredient pentru microbiologie

-impurități $\geq 11\%$ N total

$\geq 4,5\%$ N amino

-rezidu ardere $\geq 15\%$

- pierdere la uscare $\leq 8\%$
- pH 6,5 ...7,5 (25°C, 2% in apa)

Proteos-peptona

CAS: 91079-38-8

- ingredient pentru microbiologie
- impuritati $\geq 10\%$ N total
 $\geq 3\%$ N amino
- reziduu ardere $\leq 20\%$
- pierdere la uscare $\leq 6\%$
- pH 6,0 ...8,0 (25°C, 2% in apa)
- solubila in apa 2%, transparent, slab galben pana la brun

Glucoza

CAS: 50-99-7(Glucoza-D)

-sinonime: Dextroza, α -D-glucoza, β -D-glucoza

Formula Bruta: $C_6H_{12}O_6$

MG; 180,16

Punct de topire: 146°C pentru α -D-glucoza
 150 °C pentru β -D-glucoza

Clorura de sodiu

CAS: 7647-14-5

GM: 58,44

- Sinonime: sare de bucatarie, halit'sare gema, aurul alb
- Formula: NaCl
- aspect : masa solida, cristalizata, de culoare alba
- densitate: 2,165g/cm³
- stare de agregare: solida
- punct de topire: 801°C
- punct de fierbere: 1413°C
- solubilitate: in amoniac: 21,5g/L
- solubilitate in metanol: 14,9g/L
- duritate: 2,5

MgCl₂x6H₂O

CAS: 7791-18-6

GM: 203,3

- forma de agregare: substanta solida
- culoare: alburii
- fara miros
- pH = 4,5-7 i0g/L la 20°C
- punct de topire: 117°C
- solubilitate in apa: 1,670g/L la 20°C

- temperatura de descompunere :>117

-expunere orala: LD50= 8,1mg/kg

MgSO₄x7H₂O

CAS: 7487-88-9

GM: 246,48g/mol

-formula bruta: MgSO₄

-sinonime: epsomit, sare amara

-densitate: 2,66g/cm³

-la 150°C pierde apa de cristalizare- 6 moli, iar 200 °C si ultimul mol

-temperatura de topire 1124°C

-indice de refractie N =1,433; 1,455; 1,461;

-solubil in apa (269g/L la 0°C I 710g/L la 20°C0

CaCl₂x2H₂O

CAS: 10035-04-8

GM: 147,02g/mol

-densitatea 1,85g/cm³

-punctul de topire: 176°C

-solubilitatea 1000g/L la 0°C

Clorura de potasiu

CAS: 7447-40-7

GM: 74,551g/mol

Alta simbolizare: E508

-formula chimica: KCl

-forma de prezentare : pulbere alba

-densitatea : 1,988g/cm³

-punctul de topire: 771°C

-punctul de topire 1500°C

-solubilitatea in apa : 35,5g /100g apa la 20°C

-concentratia maxim admisa la locul demunca 20mg/m³

Bicarbonat de sodiu

CAS: 144-55-8

GM: 84,01g/mol

-formula chimica: NaHCO₃

-stare de agregare – pulbere : alba, solida

-densitate: 2,22g/cm³ la 20°C

-punctul de topire: incepe sa se descompuna la 50°C

Bromura de potasiu

CAS: 7647-15-6

GM: 102,89g/mol

-formula chimica: KBr

-forma de prezentare: cristale cubice albe

-densitate : 3,20g/cm³ -anhidrit la 20°C

- 2,176g/cm³ dihidrat

-punctul de topire: 755°C

-punctul de fierbere: 1393°C

-presiunea de vapori: 1.3hPa (la 806°C)

-solubilitatea 905g/L la 20°C in apa

-usor solubil in etanol

-indice de refractie: 1,642

-LD₅₀ oral la sobolani 3500mg/kg

BioGel P-Biorad P 100[NN-methylene-bis –acrylamide]

CAS: 79-06-1

GM: 71,01

Formula chimica bruta: [C₃H₅ON]CH₂CHCONH₂

-domeniul marimii particulelor: 90-200μm

-volumul tipic hidratat: 12ml/g

-viteza de curgere (cm/hr): 4,0-6/3,0-5

-domeniul de fractionare tipic 5.000-100.000 Daltons

Tris HCl

CAS: 1185-53-1

GM:121,14 g/mol

-formula bruta: C₄H₁₂O₃NCl

-pK_s: 8,2 la 20°C(variza cu temperatura)

-domeniu tamponare 7,2 – 9,0

-forma de agregare-solida

-densitate 1,35g/cm³

-punctul de topire 149°C

-foarte solubil in apa (800g/Lla 20°C) solubil in etanol, foarte greu solubil in hidrocarburi

-LD₅₀ la soareci oral 5,9mg/kg

EDTA

CAS: 60-00-4

GM: 292,24g/mol

-prescurtari: SDTA, H₄EDTA

-constituent chimic: acid etilendiaminoacetic

-formula bruta: C₁₀H₁₆N₂O₈

-densitate: 0,860g/mL la 20°C

-pK_a: 1,782

-pK_b: 12,215

-doza LD₅₀ medie orala la sobolani 1g/kg

β-Mercaptoetanol:

GM =78,13

CAS 60-24-2

- punct de topire: 100°C
- punct de fierbere: 157°C
- indice refractie: 1,4996
- densitatea vaporilor = 2,69 fata de aer
- presiunea de vapori: 11mmHg la 20°C
- limita de explozie: 18%

Metanol:

GM=32,04

CAS: 67-56-1

- formula bruta: CH₃OH
- aspect: lichid incolor
- punct de topire: 98°C
- punctul de fierbere: 65°C
- indice refractie :1,368
- solubilitate in apa :solubil in apa si solvent polari
- densitate : 0,791g/cm³
- caldura de vaporizare : 35278kJ/kmol
- punct de inflamabilitate :16,7°C(cupa inchisa)
- temp aprindere (deschis):14°C
- limita inferioara de explozie : 6,67% in amestec cu aerul
- limita superioara de explozie : 31,67% in amestec cu aerul
- vascozitate : 0,521cP,iar a vaporilor0,98x10²cP
- presiunea de vapori la 25°C este 126mmHg
- coeficientul de difuzie a lichidului 1,65x10⁻⁹m²/sec.
- caldura latent este de 1155kj/kg
- conductivitatea termica de 0,203W/m°C
- caldura specifica este de 1,47kj/kg°C

Apa:

GM=18,0153

CAS: 7732-18-5

- formula bruta : H₂O
- punct de topire : 0,0°C
- punctul de fierbere : 99,97°C
- indice refractie: 1,33251
- densitatea ; 0,998203g/cm³ la 20°C
- caldura specifica : 4,184kJ
- caldura de evaporare : 2257 kJ/kg resp 40,8 kJ/mol

- caldura de topire : 333,5kJ/kg
- punct de inflamabilitate :16,7°C(cupa inchisa)
- temp aprindere (deschis):14°C
- vascozitate :1 mPas(20°C)
- pH = 7,00 la 20°C
- punct critic : 273,946°C/22,064MPa / 322kg/m³

Dimetilcarbonat: (esterul dimetilic al acidului carbonic, glicerincarbonate, glicerolcarbonate, glicerilcarbonate, 4-hidroxi-metil-1,3-dioxolan-2-one)
GM=90,08

CAS: 616-38-6

- simbolizare :DMC
- formula bruta : C₃H₆O₃
- punct de topire 2- 4°C
- punctul de fierbere: 90°C
- densitatea : 1,069g/cm³
- indice refractie :1,368
- solubilitate in apa : 139g/L
- densitatea vaporilor(aer):3,1
- caldura specifica : 117,4J/molK(solid)respectiv 138,0J/molK(lichid)
- punct de inflamabilitate : 16,7°C(cupa inchisa)
- temp aprindere (deschis):14°C
- limita inferioara de explozie : 4,22 % vol
- limita superioara de explozie : 12,87%vol
- vascozitate : 0,625mPas

Glicidol: [2,3-epoxi-1-propanol; oxiran-2-metanol;glicid;glicidol;glicerol;glicidol]
GM = 74,08

CAS: 556-52-5(racemic)

- formula bruta : C₃H₆O₂
- starea de agregare:- lichid
- punct de topire : - 54°C
- temperatura de fierbere: 162-163°C (cu descompunere)
- presiunea de vapori: 1,2 hPa (20°C)
- densitatea : 1,069g/cm³
- indice refractie :1,433 la 20°C
- solubil in apa , alcoolii inferiori, cetone, eter, benzene, insolubil in hidrocarburi.
- caldura specifica : ≈ 0.2

Glicerina: (Glycerol ; Propan-1,2,3-triol; 1,2,3-Propantriol ; Propantriol; Glycerinum;
E422)

GM=92,09

CAS: 56-81- 5

- formula bruta : $C_3H_8O_3$
- punct de topire $18,18^{\circ}C$
- starea de agregare : lichid vascos
- temperatura de fierbere : $290^{\circ}C$ (cu descompunere)
- temperatura de fierbere la presiunea 1044mbar $290,00^{\circ}C$

266,6mbar	$243,16^{\circ}C$
79,99mbar	$208,10^{\circ}C$
20,00	$182^{\circ}C$
13,33mbar	$166,11^{\circ}C$
5,33mbar	$147,87^{\circ}C$

- indice refractie: 1,4745
- solubilitate in apa : in orice proportie, idem alcool, putin solubila in eter etilic, insolubila in benzina, benzene \, eter de petrol si chloroform
- densitate : $1,2613 \text{ g/cm}^3$
- densitatea vapori(aer):3,1
- caldura specifica; $2,424 \text{ KJ/Kg}$
- punct de inflamabilitate : $177^{\circ}C$ (glicerina 99%)
- temp aprindere (deschis): $204^{\circ}C$ (glicerina 99%)
- caldura de topire la $18^{\circ}C$: $188,4 \text{ KJ/Kg}$
- caldura de dizolvare la dilutie infinita KJ/ Kg : -62,69
- caldura de evaporare KJ/Kg la $55^{\circ}C$ 959, 3

155 $^{\circ}C$	895, 6
-----------------	--------
- tensiune superficial la $20^{\circ}C$ $6,34 \times 10^{-5}$
- punctul de aprindere (99% Glicerina) $^{\circ}C$: 204

Fluid MAG-PEA

- dispersie apoasa de nano particole magnetice
- articol numar:-4117-1(1ml); 4117-5(5 ml)
- greutate volumetrica : 25 mg/ml
- miezul: magnetit
- diametru 50-200nm
- numar de particole: 50nm ; $\sim 1,3 \times 10^{16}/g$

100nm	$\sim 1,8 \times 10^{15}/g$
200nm	$\sim 2,2 \times 10^{14}/g$
- densitate ; $1,25 \text{ g/cm}^3$
- tip de magnetizare: superparamagnetic
- grupe functionale: grupe $-NH_2$
- conservare : $4-8^{\circ}C$ fara inghet
- garantat:-2 ani de la data fabricatiei

Fluid MAG-Amine

- dispersie apoasa de nano particole magnetice

-punct de topire -8°C

-solubilitate-insolubil in apa

1-butil-3-tetrafluoroborat [BMIM][BF4]

-CAS :174501-65-6

GM : 226,02

-concentratie : $\geq 97,0$ (HPLC)

1-butil-3-metilimidazolclorida[BIMIM][Cl]

CAS: 79917-90-1

-sinonim: BMIMCl

-formula Bruta: $C_8H_{15}ClN_2$

-punct topire $\approx 70^\circ C$

Acetona

CAS: 67-64-1

GM : 58,08

-formula bruta: C_3H_6O

-sinonim propanon, propan-2-on, 2-propanin, dimetilcetona,acetone, spirituspiroaceticus

-densitate $0.791 g/cm^3$

-punct de topire : $-95^\circ C$

-punct de fierbere: $56^\circ C$

-presiunea de vapori :246 hPa la $20^\circ C$

-miscibila cu apa si multi solvent organici

-indice de refractie: 1,3588 la $20^\circ C$

-concentratia maxima admisa : $1,2 g/m^3$

-toxicitate orala la sobolani DL_{50} : $5,8 g/kg$

- limita inferioara de explozie in amestec cu aerul : 2,2% vol

- limita superioara de explozie in amestec cu aerul : 14,3% vol

Glutaraldehida

CAS: 111-30-8

GM : 58,08

-alte denumiri : glutaraldehyde, glutardialdehyde, glutaric acid dialdehyde, glutaric aldehyde, glutaric dialdehyde, 1,5-pentanedial

-formula bruta : $C_5H_8O_2$

-forma de prezentare :-lichid limpede

- miros:- patrunzator

-densitatea : $1,6 g/ml$

-punctul de topire: $-14^\circ C$

-solubilitatea in apa : miscibil, reactioneaza

-presiunea de vapori : 17mmHg la $20^\circ C$

-punctul de inflamabilitate – necombustibil

Tetrahidrofur –THF

CAS:109-99-9

GM.:72,11

-abreviere: THF

-miros :asemanator eterului

-densitate 0,8892g/cm³ la 20°C, lichid

-punctul de topire :- 108,4°C

-punctul de fierbere :65,81°C

-solubilitatea in apa :-miscibil

-presiunea de vapori 132mmHg la 20°C

-vascozitatea la 25°C : 0,48cP

-punctul de aprindere : -14°C

-limite de explozie : 2%-11,8%

-LD50 la sobolani oral:1650mg/kg

-limite admisibile in zona: 200ppm(59mg/m³)

Carbonat de glycerol

CAS: 931- 40- 8

-formula bruta: C₄H₆O₄

-alte denumiri: -glicerin carbonat ; glycerol carbonate; gliceril carbonate; 4-hidroximetil-1,3-dioxolan-2-one

-greutatea moleculara: 118,09

-aspect : lichid limpede fara suspensii

-punctul de topire : - 69°C

-punctul de fierbere : 137°C

la 0,8mmHg : 160 °C

0,1 mmHg: 110-115°C

-punctul de aprindere : >190°C(lit.212°C)

-densitate 1,4 g/cm³(1,3990-1,4050)

-indice de refractie : 1,4570-1,4610 la 20°

-pH(acid) = 4 – 6,5

-vascozitate cinematic: 61cSt la25°C

-solubilitate :-miscibil cu apa

-puritate : >90% GC

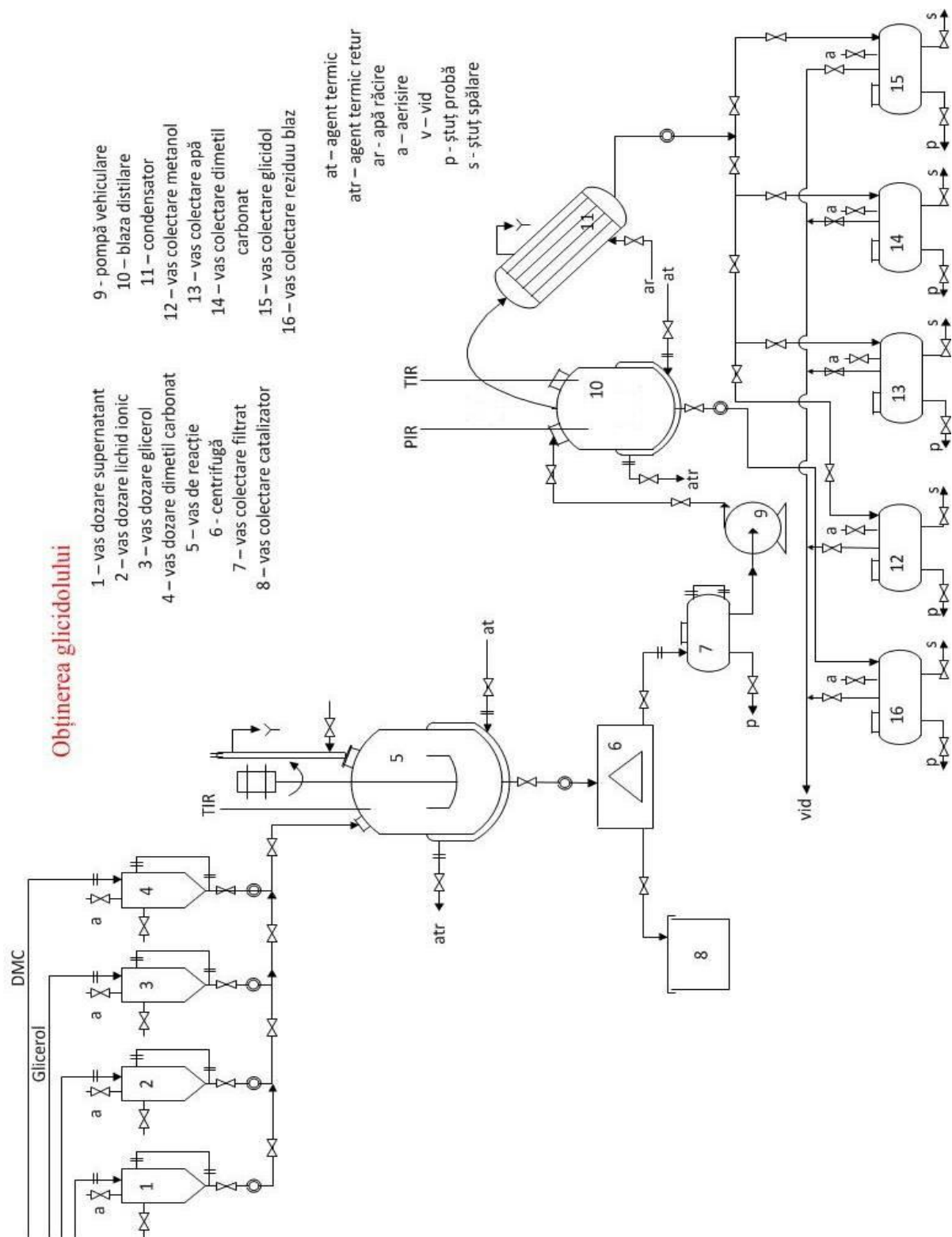
-Carbonat de glicerina: 93%g

-Glicerina: 2,0%g

-Total carbonati: 98,5%g

-Apa: 0,05%g

Schema instalației pilot pentru funcționare în condiții optime



Schema instalației pilot optimizate pentru sinteza glicidolului, prezentată mai sus permite verificarea la scară marită a tehnologiei elaborate în toate variantele de lucru avute în vedere în faza de laborator. Funcționarea acesteia decurge astfel: se introduce cu pompele centrifuge din rezervoarele de zi constituentii chimici – respectiv materiile prime care sunt depozitate în acestea, în vasele de dozare aferente și plasate în poz.1-4. Din aceste vase de dozare se dozează conform rețurii de lucru stabilite cantitatea prescrisă în vasul de reacție din poz.5. Acesta este echipat cu agitator mecanic acționat electric în regimul de temperatură dorit. Vasul este termostatat după regimul de termostatare stabilit ca și optim de 50°C timp de 24 de ore. La expirarea duratei de reacție se trece conținutul în centrifuga din poz.6. Catalizatorul se reține în containerul din poz.8, iar filtratul este deversat în vasul din poz.7. De aici prin intermediul pompei din poz.9 se alimentează în blază din poz.10, blază care de fapt poate fi un distilator rotativ sub vid. Vaporii sunt condensați în racitorul condensator din poz.11 și colectați în funcție de compoziția lor în vasele din poz.12-16 în ordinea: metanol/THF, DMC, apă, carbonat de glicerina, glicidol, glicerina și (eteri, poleteri ai glicerinei-blaz). Urmele de apă pot ieși împreună cu metanolul.

Testarea instalației pilot

Testele experimentale au constatat în evaluarea capacității catalitice a 5 supernatanți obținuți prin multiplicare celulară a microorganismelor de tipul *Marinococcus halophilus* în prezența bio-glicerolului (1-3%). În acest fel s-a încercat o adaptare a enzimelor exprimate extracelular la matricea de impurități a bio-glicerolului. Testele inițiale au fost realizate cu glicerol pur. Sistemul biocatalitic a fost format din glicerol, dimetil carbonat (1:10 raport molar glicerol :DMC) și 10% biocatalizator (v/v). La acest sistem s-a adăugat un co-solvent în proporție 1:1 cu DMC (v/v). Co-solvenții testați au fost ciclohexan, tetrahidrofuran, acetonitril, limonen, limonen oxid, p-cimen, 2-metil tetrahidrofuran, ciclopentanol, 2-propanol, carvacrol și α -pinen oxid. Pentru fiecare în parte a fost evaluată eficiența procesului biocatalitic având în vedere conversia glicerolului, selectivitatea în glicerol carbonat, glicidol și derivați ai acestora sub formă polimerică. Calcularea conversiei și a selectivității s-a realizat direct pe cromatograma GC (Fig. 1., 2.)

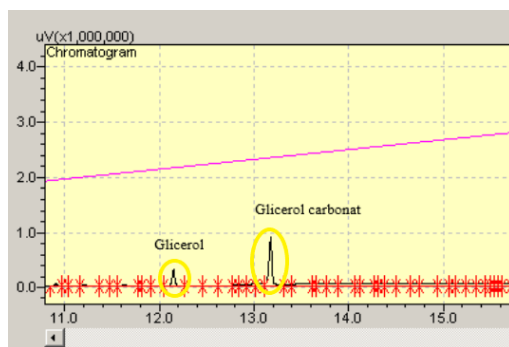


Fig.1. Cromatograma GC-FID (glicerol și glicerol carbonat)



Fig.2. Cromatograma GC-FID (glicidol și polimeri)

Rezultatele comparative privind conversia glicerolului și selectivitatea în glicerol carbonat, glicidol, respectiv polimeri pentru fiecare supernatant în funcție de co-solventul utilizat sunt prezentate în Fig. 3.- 7.

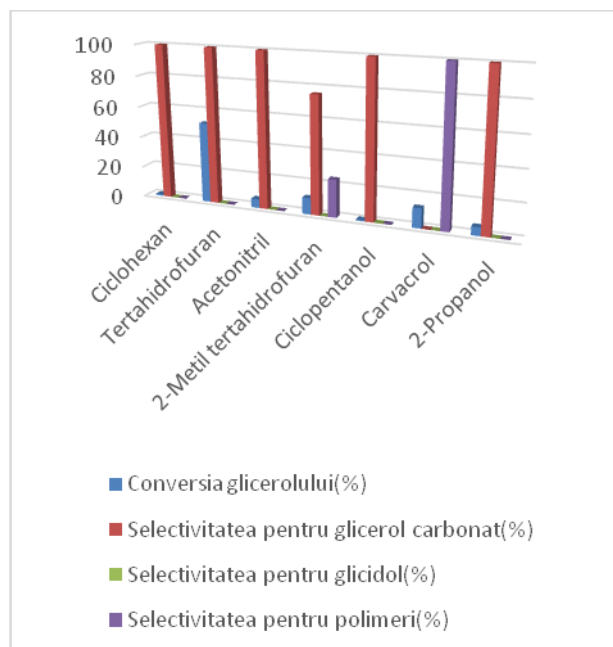


Fig 3. Supernatant LC37 Mediaș

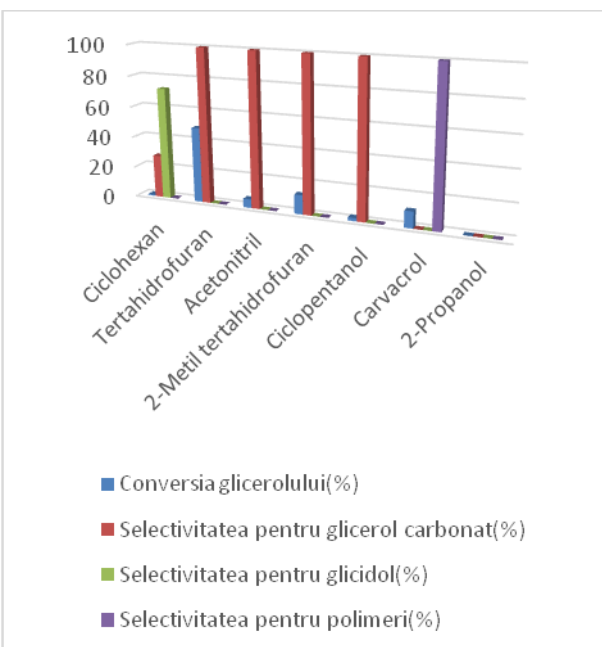


Fig 4. Supernatant LN1-10 Slobozia

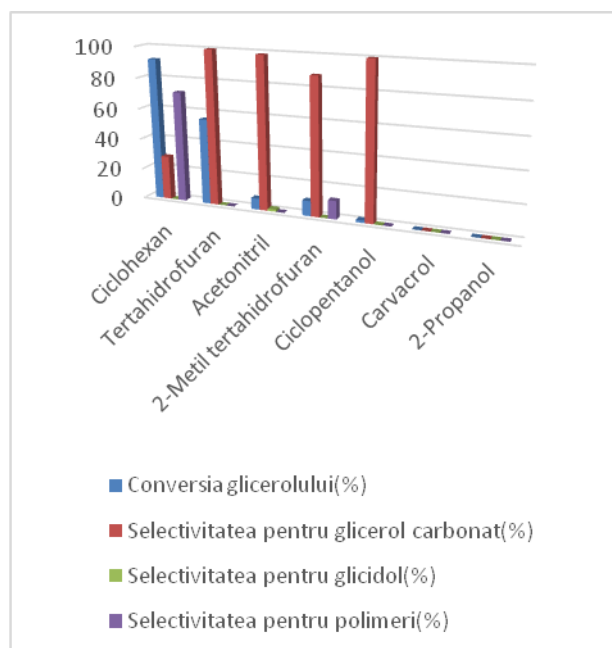


Fig 5.Supernatant LN4-1Palmier

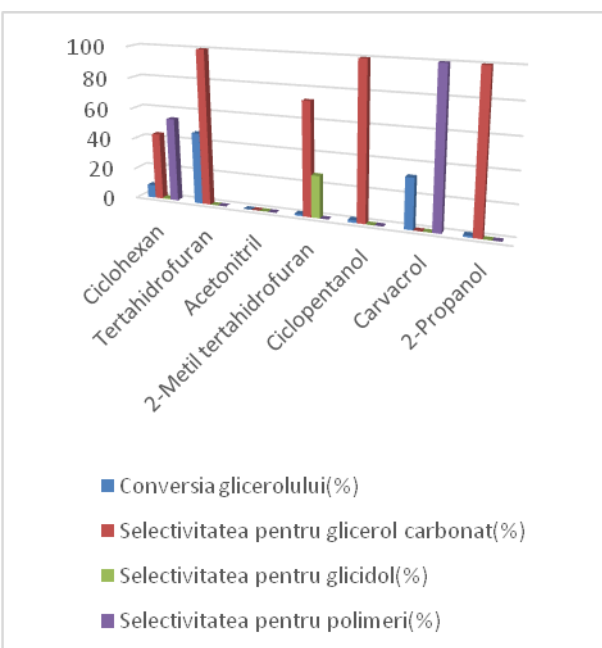


Fig 6.SupernatantLD2Floarea Soarelui

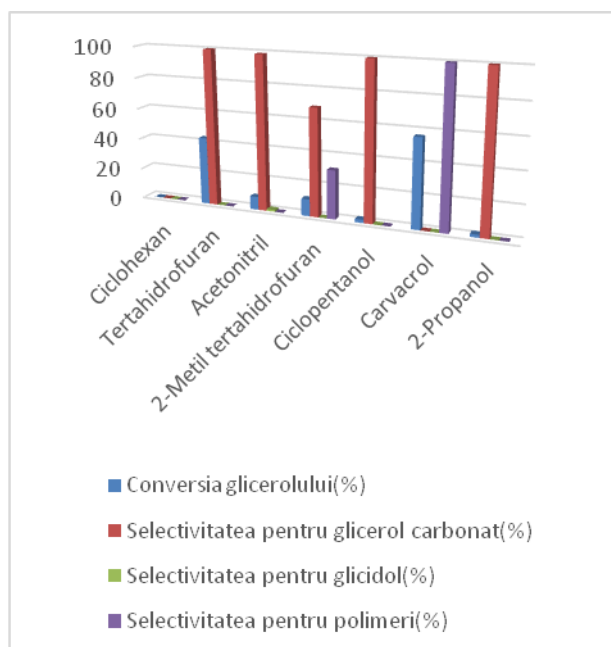


Fig 7.Supernatant LN2-5Rapiță

Rezultate – Diseminare:

Lucrari ISI:

Simona Neagu, Roxana Cojoc, Mirela Enache, Oana Catalina Mocioiu, Aurica Precupas, Vlad Tudor Popa, Ioana Gomoiu, Madalin Enache, 2017, Biotransformation of Waste Glycerol from Biodiesel Industry in Carotenoids Compounds by Halophilic Microorganisms, Waste and Biomass Valorization, *acceptat*

Mirela Enache, Ana Maria Toader, Victoria Neascu, Gabriela Ionita, Madalin Enache, 2017, Spectroscopic investigation of the interaction of the anticancer drug mitoxantrone with sodium taurodeoxycholate (NaTDC) and sodium taurocholate (NaTC) bile salts, Molecules, 22, 1079.

Prezentări orale conferințe:

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu si Ioana Gomoiu, *Halophilic microorganisms from mural paintings in old Romanian historical monument church*, 15th World Congress on Biotechnology and Biotech Industries Meet, Roma, Italia, 20 – 21 martie 2017.

Madalin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, Ioana Gomoiu, Delia Ionela Dobre, Ancuta Roxana Trifoi, *Extracellular Enzymes from Halophilic Bacteria with Potential in Agricultural Secondary Flow Recovery Products*, ICAFBFS 2017: 19th International Conference on Agricultural, Food and Biological Sciences, Roma, Italia, 18 - 19 Septembrie, 2017.

M. Tudorache, A. Negoii, S. Neagu, I. Gomoiu, M. Enache, V.I. Parvulescu, *Enhancement on the biocatalytic synthesis of glycerol carbonate as green solvent of the future*, International Symposium in Green Chemistry, La Rochelle, Franta, mai 2017.

M. Tudorache, A. Negoii, V.I. Parvulescu, *Transformation of glycerol into glycerol carbonate/glycidol based on biocatalysis in non-conventional media*, 13th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Wroklaw, Polonia, iunie-mai 2017.

Mirela Moldoveanu, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Larisa Florescu, Ioana Lucaci, Ioan Pacesila, Ioana Gomoiu, *Microorganisme prezente in instalatiile piezometrice ale barajului Dridu (raul Ialomita)*, Preocupari recente in cercetarea, conservarea si valorificarea patrimoniului cultural, editia XII, Targu Mures, Romania, 28 – 30 iunie 2017.

Postere conferințe:

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Ioana Gomoiu, *Novel strain of *Garicola* genus isolated from frescoes of Hurezi Monastery, Romania*, 7th Congress of European Microbiologists, Valencia, Spania, 09 – 14 iulie 2017.

Ioana Gomoiu, Madalin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Ioana Maria Cortea, Roxana Radvan, *Carotenoids producing bacteria: a cause of mural painting biodeterioration in some Romanian historical monasteries*, 7th Congress of European Microbiologists, Valencia, Spania, 09 – 14 iulie 2017.

M. Tudorache, A. Negoii, A. Gheorghe, M. Enache, G.-M. Maria, A. Viana, V.I. Parvulescu, *Green alternative for the valorization of the terpenoidic fraction of turpentine - biocatalytic conversion of α -pinene into value-added products*, International Symposium in Green Chemistry, La Rochelle, Franta, mai 2017.

M. Tudorache, A. Negoii, A. Gheorghe, M. Enache, G.-M. Maria, A. Viana, V.I. Parvulescu, *Valorization of α -pinene from turpentine - biocatalytic conversion of α -pinene into flavours and fragrances*, 13th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Wroklaw, Polonia, iunie-mai 2017.