



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 3 – 2016 - 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 3:

- 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 I***

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
- 2 lucrări ISI în subiect comun cu al proiectului, aflate în evaluare
- 4 lucrări în alte reviste (BDI), în subiect comun cu al proiectului (1 publicată și 3 acceptate)
- 2 lucrări în volumul unei conferințe (cu ISBN – capitole carte)
- Participarea la 10 conferințe științifice de specialitate (4 prezentări orale și 6 postere)

Activitatea consorțiului în cursul etapei III (2016) a proiectului BioGlyCat s-a desfășurat în cadrul a 11 activități experimentale generice (trei aferente CO, cinci aferente P1, una aferentă P2 și două în care au fost implicați membrii consorțiului) care au permis punerea la punct a 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 opt articole științifice de specialitate dintre care două publicate în reviste ISI, două acceptate în reviste ISI, unul publicat în revistă BDI și trei acceptate în reviste BDI. De asemenea, au fost publicate două capitole de carte. Membrii consorțiului au participat la conferințe științifice de specialitate unde au fost susținute 10 lucrări (4 prezentări orale și 6 postere). Conferințele au fost organizate în Germania, Olanda, Republica Moldova și România.

Descrierea rezultatelor principale aferente Etapei 3

Evidențierea activității lizin-decarboxilazei la tulpini de bacterii halofile/halotolerante

Punerea în evidență a activității decarboxilazei, precum și purificarea și caracterizarea acestei enzime au fost realizate pe tulpini cu diferite grade de halofilie izolate din lacul sărat Letea, situat în proximitatea localității de frontieră cu același nume, în Delta Dunării, în apropierea frontierei dintre România și Ucraina.

Mediul utilizat pentru testarea prezenței lizin decarboxilazei a avut următoarea compoziție (g/L): peptic digest of animal tissue 5, yeast extract 3, dextroză 1, brom cresol purpur 0.02, L-lysine hydrochloride 5, NaCl 50 (Sigma-Aldrich). Detectarea decarboxilazelor s-a realizat pe baza evidențierii unei variații de pH. S-au repartizat câte 4.5 mL mediu steril în tuburi și s-a transferat aseptically un volum de 0.5 mL inocul bacterian, la care s-au adăugat 2 mL de ulei de parafină pentru asigurarea anaerobiozei. Tuburile inoculate au fost incubate la 35°-37°C pentru 24h. Fermentarea glucozei de către bacteriile cu metabolism fermentativ conduce la acidifierea mediului ceea ce face ca indicatorul de pH (brom cresol purpur) să determine schimbarea culorii mediului de la violet la galben. Cultura bacteriană a fost incubată pentru încă 24h la 35°C pentru a permite microorganismelor să utilizeze aminoacidul. Dacă tulpina bacteriană nu prezintă decarboxilaze în echipamentul lor enzimatic, mediul rămâne galben, iar în prezența acestor enzime are loc o realcalinizare secundară a mediului datorită formării diaminelor (revenirea mediului la culoarea violet).

Tulpina	Fermentarea glucozei		Utilizarea aminoacidului	
	Schimbarea culorii mediului de la violet la galben		Schimbarea culorii mediului de la galben la violet	
	24h	Alt interval de timp (zile)	48h	Alt interval de timp(zile)
LN1-17	+		+	
LN4-26	+		-	+(7 zile)
L11	-	+(2 zile)	-	+(7 zile)

Datele experimentale au evidențiat faptul că un număr de 15 tulpini de bacterii halofile/halotolerante (din cele 102 testate) au prezentat capacitatea de a acidifica mediul de cultură, observându-se o schimbare a culorii mediului de cultură de la violet la galben și doar 3 tulpini (tabelul de mai sus) au prezentat în echipamentul lor enzimatic decarboxilaze, rezultatul pozitiv apărând după 48 de ore de incubare (tulpina LN1-17), respectiv 7 zile (tulpinile L11 și LN4-26).

Testarea capacității de creștere a tulpinilor de bacterii halofile producătoare de decarboxilaze în prezența glicerolului rezidual 1%

În scopul evidențierii capacității de creștere a tulpinilor bacteriene în prezența glicerolului rezidual, s-a pregătit mediul de cultură MH, cu următoarea compoziție: (g/L): yeast extract, 10; proteose peptona 5; glucoza 1; NaCl, 100; MgCl₂·6H₂O, 7; MgSO₄·7H₂O, 9,6; CaCl₂·2H₂O, 0,36; KCl 2; NaHCO₃ 0,06; NaBr 0,026; agar 20 (Ventosa și colab., 1972), la care s-a

adăugat 1% glicerol rezidual, după etapa de sterilizare. Sursele de glicerol au fost reprezentate de ulei de rapiță, ulei de floarea soarelui, ulei de palmier, ulei provenit de la o societate comercială din Mediaș și Slobozia. Au fost realizate 5 variante ale mediului de cultură, pentru fiecare sursă de glicerol rezidual. Mediul a fost repartizat în plăci Petri și inoculat în striuri. Plăcile au fost incubate pentru 48h, la 28-30°C.

Tulpina	Glicerol Mediaș	Glicerol Slobozia	Glicerol Floarea soarelui	Glicerol Rapiță	Glicerol Palmier
LN1-17	++	+	+	++	+++
L11	++	+++	+	+	++
LN4-26	++	+++	+/-	++	++

Rezultatele din tabel arată că tulpinile care prezintă decarboxilaze au capacitatea de a transforma glicerolul rezidual în diferite grade, cea mai scăzută fiind înregistrată în cazul glicerolului rezidual obținut în urma obținerii biodieselului pornind de la floarea soarelui.

Influența salinității asupra creșterii unor tulpini de microorganisme halofile

A fost studiată influența salinității asupra creșterii unor tulpini de bacterii halofile care pot sintetiza decarboxilaze prin stabilirea limitelor intervalului de salinitate care permite dezvoltarea bacteriană. Mediul de cultură a avut următoarea compoziție (g/L): yeast extract, 10; proteose peptonă 5; glucoză 1; MgCl₂·6H₂O, 7; MgSO₄·7H₂O, 9,6; CaCl₂·2H₂O, 0,36; KCl 2; NaHCO₃ 0,06; NaBr 0,026; NaCl (0; 29,25; 58,5; 117; 175,5; 234), agar 20 (Ventosa și colab., 1972). Tulpinile au fost inoculate pe mediu MH solid suplimentat cu diferite concentrații de NaCl, respectiv: 0, 1,7, 2, 3, 4 M. Tehnica însămânțării în striuri a fost utilizată pentru test, iar plăcile au fost incubate la termostat la 28°C, timp de 48-72 ore.

Tulpina	Concentrația de NaCl (M)					
	0M	0.5M	1M	2M	3M	4M
LN1-17	+++	+++	+++	+++	++	+/-
LN4-26	++++	+++	+++	+++	++	+/-
L11	++	+++	+++	+++	+++	++

Rezultatele obținute au arătat că, din totalul de 102 tulpini izolate din probe de apă prelevate din lacul sărat Letea, un număr de 57 de tulpini s-au dezvoltat și în absența NaCl, putând fi încadrate în categoria bacteriilor halotolerante. De asemenea, un număr de 9 tulpini bacteriene au cunoscut o creștere în intervalul 0-4 M NaCl. 33 de tulpini bacteriene s-au dezvoltat în intervalul 0.5-3M NaCl, fiind încadrate în categoria bacteriilor moderat halofile, conform schemei de clasificare propusă de Kushner (1985). S-a observat, de asemenea, că un număr de 3 tulpini de bacterii nu s-au mai dezvoltat pe nici o variantă a mediului de cultură.

Selectarea enzimelor (lipaza și decarboxilază) - Partea a II-a

Testele biocatalitice de obținere a glicerol carbonatului (GlyC) din glicerol pur (Gly) s-au realizat după o procedură tipică, după cum urmează: glicerolul pur (d=1.26 g/cm³, 0.1 g, 1

mmol) s-a dizolvat în 1 mL de DMC (dimetil carbonat), în raport molar Gly:DMC = 1:10, într-un tub Eppendorf. La acest amestec s-au adăugat 200 μ l catalizator - soluție supernatant (A3, A13, rapiță, M3, FL1). După închiderea ermetică a vasului de reacție, masa de reacție a fost incubată sub agitare, timp de 24 de ore, la o temperatură variată (50 - 80 °C).

Procedura de lucru pentru obținerea GlyD din GlyC s-a realizat după cum urmează: într-un tub Eppendorf s-au dizolvat 100 μ l GlyC, în 900 μ l THF. La amestecul format s-au adăugat 200 μ l catalizator - soluție supernatant (A3, A13, rapiță, M3, FL1). Masa de reacție a fost lasată sub agitare (1000 rpm), la 80 °C, timp de 24h.

În fiecare din cele doua cazuri prezentate mai sus, după reacție, catalizatorul a fost separat din mediul de reacție, iar faza lichidă a fost evaporată la vacuum, la 50 °C. Probele obținute au fost silanizate, înainte de a fi analizate la cromatograf, după următoarea procedură: peste amestecul de produși rămas după evaporare se adaugă 1 mL piridină și 1 ml agent de silanizare – BSTFA (bis-trimetilsilil-trifloroacetamidă). Amestecul rezultat este menținut la o temperatură de 60°C, timp de 30 minute, sub agitare. Probele astfel obținute au fost supuse analizelor prin cromatografie de gaze cuplată cu detector cu ionizare în flacăra (GC-FID, Schimadzu GC-2014, Thermo Electron Scientific Corporation, USA).

Au fost testați diferiți biocatalizatori bifuncționali pe bază de supernatanți cu conținut de lipază și decarboxilază, proveniți de la culturi biologice dezvoltate în condiții diferite. Probele biologice obținute în urma colaborării cu Institutul de Biologie București al Academiei Române, au fost prelucrate și testate în mediul de reacție, individual, în vederea obținerii produșilor doriți. Acestea au fost testate separat în fiecare din cele doua etape de reacție (i) glicerol pur la glicerol carbonat, și ii) glicerol carbonat la glicidol, atât în absența unui solvent, cât și a THF-ului, deoarece studiile relatate în literatura au arătat faptul că THF favorizează formarea glicidolului.

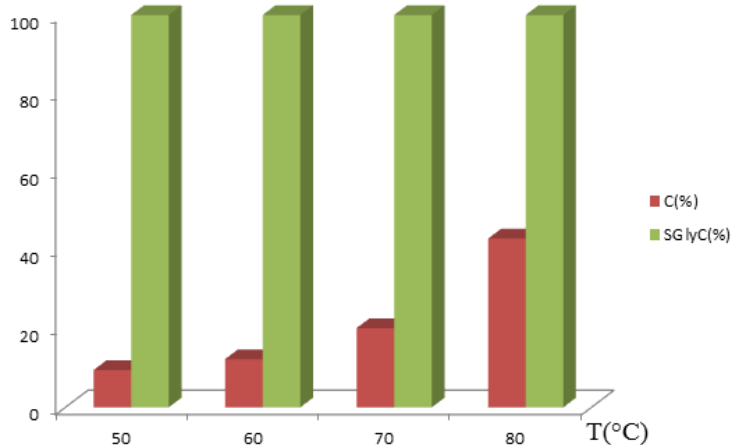


Figura 1. Influența temperaturii de reacție asupra performanțelor catalitice ale supernatantului rapiță.

Tinând cont de datele experimentale raportate în literatură, într-o prima etapă a studiului realizat s-a optimizat temperatura de reacție pentru bioconversia glicerolului în prezența celor cinci probe biocatalitice (supernatanții notați A3, A13, rapiță, M3, FL1) selectate

pentru acest proces. Astfel că, într-un tub Eppendorf, peste 200 μ l de supernatant, s-au adăugat glicerol și DMC în raport molar 1:10. Amestecul format a fost lăsat sub agitare, timp de 24 de ore, la temperaturi care au variat între 50-80°C. Rezultatele experimentale sunt prezentate în Figura 1. În urma testelor catalitice efectuate, s-a observat că temperatura de 80 °C asigură o conversie ridicată, pentru fiecare supernatant testat. S-a obținut cea mai bună conversie a glicerolului de 43% în cazul supernatantului notat rapiță (Figura 1). Este de menționat faptul că, conversia glicerolului a crescut gradual cu creșterea temperaturii. Acest fapt demonstrează că enzimele din supernatant sunt termo-active (își pastrează activitatea catalitică cel puțin până la temperatura de 80 °C). De asemenea, a fost urmărită influența timpului de reacție, până la 48 de ore, însă nu s-a observat nici o modificare asupra conversiei.

În ceea ce privește sinteza glicerol carbonatului din glicerol pur și sinteza glicidolului din glicerol carbonat, în aceleași condiții de temperatură și timp de reacție, cele mai bune rezultate s-au obținut în prezența probelor biologice supernatant rapiță și supernatant A3 (Tabelul 1). Astfel, în prima etapă, conversia Gly a fost de 43% și selectivitatea în GlyC de 100 % (proba biologică rapiță), iar în cea de a doua etapă conversia GlyC a fost totală cu selectivitate în GlyD de 100 % pentru toate cele cinci probe biologice testate (Tabelul 2).

Tabelul 1. Sinteza GlyC din Gly pur în prezența biocatalizatorilor bifuncționali pe bază de enzime din supernatant.

Nr. Crt.	Biocatalizator	C _{Gly} (%)	S _{GlyC} (%)
1	A3	10.8	100
2	A13	25.11	100
3	Rapiță	43	100
4	M3	37.7	100
5	FL1	30.16	100

Condiții de reacție: 0.1g Gly, 1 ml DMC, 200 μ l supernatant, 80°C, 24h, 1000 rpm

Tabelul 2. Sinteza GlyD din GlyC în prezența biocatalizatorilor bifuncționali pe bază de enzime din supernatant.

Nr. Crt.	Biocatalizator	C _{GlyC} (%)	S _{GlyD} (%)
1	A3	100	100
2	A13	100	100
3	rapita	100	100
4	M3	100	100
5	FL1	100	100

Condiții de reacție: 100 μ l GlyC, 900 μ l THF, 200 μ l supernatant, 80°C, 24h, 1000 rpm

În urma rezultatelor bazate pe screeningul anterior se poate observa faptul că supernatantul obținut prin implicarea uleiului de rapiță oferă activitate catalitică optimă sistemului de sinteză a GlyC din glicerol, față de celelalte probe testate. Totodată, activitatea

catalitică specifică decarboxilazei este prezentă în toate supernatantele testate, însoțită de o selectivitate bună pentru GlyD.

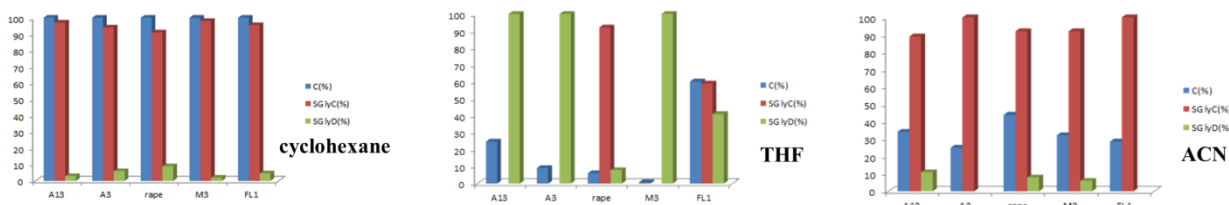
Prepararea biocatalizatorului cooperativ-dual - partea a II-a

Pe baza rezultatelor obținute prin optimizarea temperaturii și a timpului de reacție, în următoarea etapă s-a urmărit îmbunătățirea selectivității în producții doriți, și anume glicerol carbonat (GlyC) și glicidol (GlyD).

Un parametru important de reacție îl constituie mediul de reacție. Până în prezent reacția a decurs în absența unui solvent adăugat specific ca mediu de reacție, DMC jucând și acest rol pe lângă cel de reactant. Totuși, este cunoscut faptul că lipaza preferă medii puternic hidrofobe și totodată este una din puținele enzime care își păstrează activitatea catalitică în mediu organic. Pe baza acestor "adevăruri experimentale" s-a propus testarea sistemului în prezența unui adaos de solvent. Au fost realizate teste biocatalitice în prezența a diferiți solvenți organici cu proprietăți diferite (ciclohexan, THF, ACN, ciclohexena, n-octan, trifluoroetanol), în încercarea de optimizare a condițiilor de reacție. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul și figura de mai jos (Tabel 3 și Figura 2).

Tabel 3 . Influența adaosului de solvent organic asupra procesului biocatalitic de sinteză a GlyC din glicerol.

Solvent organic	S13			Srapita			SA3			SM3			SFL1		
	C	S ₁	S ₂	C	S ₁	S ₂	C	S ₁	S ₂	C	S ₁	S ₂	C	S ₁	S ₂
Ciclohexan	100	97	2	100	96	4	100	97	2	100	98	2	100	98	1
THF	1	0	100	4	86	13	1	0	100	3	100	0	61	95	5
ACN	26	0	100	32	0	100	25	0	100	0	0	0	0	0	0
Ciclohexena	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
n-octan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
trifluoroetanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Reaction conditions: 0.1g Gly, 1 ml DMC, 1ml organic solvent, 200 μl supernatant, 24h, 80 °C

Figura 2. Influența solventului organic asupra sistemului biocatalitic luat în studiu în prezența biocatalizatorilor bifuncționali pe bază de enzime din supernatant.

În acest caz, experimentele efectuate prin adăugarea unui solvent organic au condus la îmbunătățirea semnificativă atât a conversiei glicerolului pur, cât și a selectivităților în producții doriți. Raportul solventului organic la dimetil carbonat a fost de 1:1 (1 ml DMC la 1ml solvent organic). Efectul major observat a fost conversia totală a glicerolului în cazul utilizării

ciclohexanului, indiferent de tipul probei biologice testate; selectivități de peste 90% în GlyC, dar selectivități reduse în GlyD au fost obținute pentru ciclohexan. În schimb, în cazul utilizării THF, conversiile sunt extrem de mici, în ciuda selectivității avantajoase în GlyD, însă rezultatele obținute sunt încurajatoare. Totuși, este de remarcat faptul că prezența adaosului de solvent îmbunătățește performanțele de sinteză ale sistemului biocatalitic în vederea obținerii GlyD. De asemenea, selectivitatea în GlyC scade în favoarea selectivității în GlyD atunci când THF este prezent în sistem. Deci, THF favorizează formarea de GlyD ca produs de reacție, ceea ce confirmă datele de literatură conform cărora THF poate constitui un mediu favorabil de reacție pentru producerea GlyD. Totodată, ciclohexanul îmbunătățește conversia glicerolului, chiar dacă numai până la stadiul de GlyC. Comportamentul este general valabil pentru supernatantele testate. ACN oferă un mediu de reacție bun pentru sinteza GlyC față de GlyD. Totuși, conversia glicerolului este scăzută, de aceea nu poate fi indicat pentru testele viitoare. Doar în cazul supernatantului rapită apare o diferență, ACN având performanțe similare cu ale ciclohexanului. Comportamentul sistemului biocatalitic dual în prezența solventului organic adăugat în proporție mică se bazează pe interacția enzimei cu solventul și pe solubilitatea reactanților/produșilor de reacție în solventul utilizat. Ciclohexanul oferă un mediu de reacție hidrofob ceea ce favorizează activitatea catalitică a lipazei. La fel se întâmplă pentru cuplul THF și decarboxilază. De aceea se consideră că un amestec ciclohexan-THF va asigura un mediu optim de conversie pentru glicerol către GlyD.

În acest scop, într-un tub Eppendorf s-au dizolvat 100 μl Gly pur, în 1000 μl DMC. La amestecul format s-au adăugat 200 μl catalizator - soluție supernatant (A3, A13, rapită, M3, FL1), și 1000 μl amestec de solvenți organici ciclohexan și THF (în raport de 1:1). Masa de reacție a fost lăsată sub agitare (1000 rpm), la 80 °C, timp de 24h. După reacție, supernatantul a fost separat prin centrifugare, apoi faza lichidă a fost ulterior evaporată la vid, la 50°C. Producții uscați au fost ulterior derivați și apoi analizați prin GC-FID.

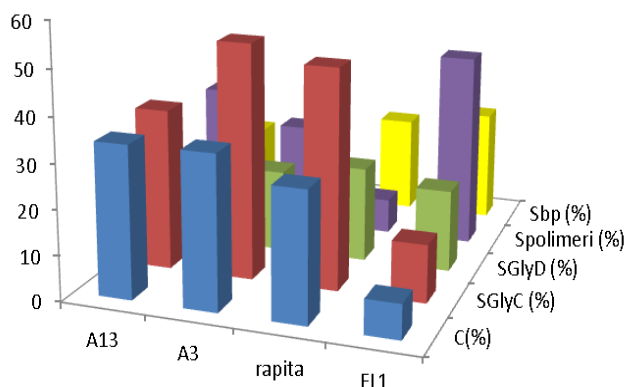


Figura 3. Performanțele catalitice ale biocatalizatorilor bifuncționali pe bază de enzime din supernatant în transformarea glicerolului folosind un amestec de co-solvenți organici

Figura 3 prezintă un comportament asemănător celui descris anterior pentru biocatalizatorii testați în sistem. Totuși, în acest caz se poate discuta despre o îmbunătățire

semnificativă a selectivității în GlyD atunci când în sistem se adaugă un amestec de solvenți organici, în acest caz fiind vorba de ciclohexan și THF în raport de 1:1 în schimb, conversia glicerolului atingând valori mai scăzute, de 32%, și, de asemenea, se poate observa formarea polimerilor. Acest fapt poate fi explicat datorită formării glicidolului, care este instabil și care polimerizează ușor.

Pentru etapa următoare se propune optimizarea raportului dintre ciclohexan și THF pentru a obține un balans avantajos între conversie și selectivitate.

În cadrul sistemului biocatalitic cu adaos de solvent organic a fost optimizată temperatura de reacție. Astfel, au fost realizate reacții la temperaturi precum 60, 70 și 80°C. Rezultatele experimentale aferente sunt prezentate în figura 4. Se observă că temperatura influențează pozitiv transformarea glicerolului. Conversia glicerolului crește continuu de la 60°C până la 80°C. Deoarece 80°C asigură o conversie totală a glicerolului, nu s-a mers la o temperatură mai mare. Totodată este cunoscut faptul că lipaza este o enzimă stabilă termic în general, dar nu poate rezista la temperaturi peste 80°C. O dată cu creșterea temperaturii se observă și o modificare minoră a selectivității. La temperatura de 60°C, selectivitate este totală în GlyC. Pentru temperatura de 80°C, selectivitatea în GlyC scade cu câteva procente, pe care le câștigă selectivitatea în glyD. Acest fapt demonstrează că obținerea GlyD este favorizată de temperatură.

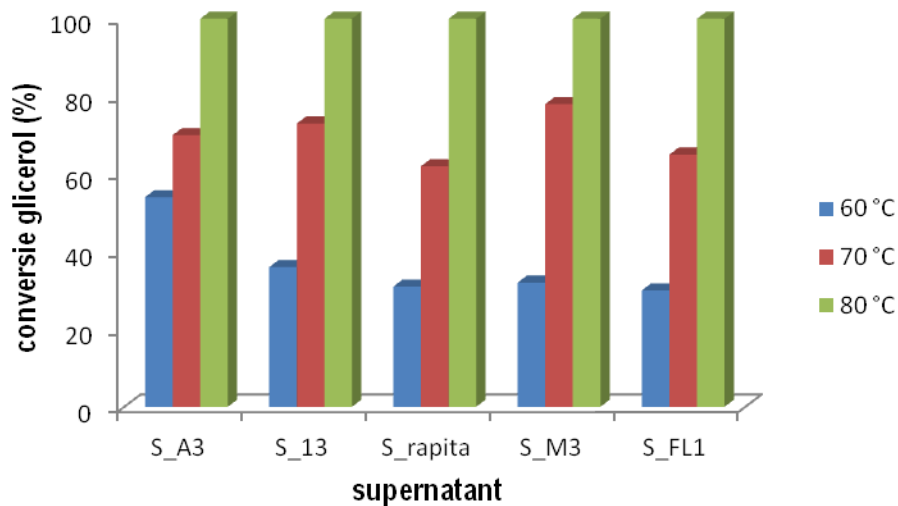


Figura 4. Influența temperaturii de reacție asupra bio-conversiei glicerolului.

Studiul experimental a fost continuat prin testarea sistemului biocatalitic dual, construit și optimizat până în prezent, cu glicerol rezidual procurat din industria biodiesel. Astfel, probele biologice obținute în urma colaborării cu Institutul de Biologie București al Academiei Române, au fost prelucrate și testate în mediul de reacție individual, folosind ca sursă de glicerol - glicerolul rezidual generat în urma procesului de biodiesel în reactoarele localizate în Slobozia (Expur) și Medias (ICPAO).

Impuritățile din glicerolul rezidual pot influența semnificativ conversia glicerolului în producția doriți. Aceste impurități (metanol, săruri, săpunuri, trigliceride) pot inhiba creșterea

celulară în cazul proceselor biologice, sau pot otrăvi catalizatorul într-un sistem de reacții catalitice convenționale.

Studiile realizate au demonstrat faptul că matricea glicerolului rezidual influențează pozitiv (amplifică) activitatea catalitică, deoarece conversia generală a procesului a fost în jurul valorii de 99 % (Figura 5). Deci, activitatea catalitică a biocatalizatorilor este una mare, însă, selectivitățile în glicerol carbonat și glicidol suferind o scădere semnificativă. Pe lângă produșii de reacție urmăriți au fost detectați produși polimerici. Se presupune că aceștia provin din polimerizarea GlyD, deoarece acest compus este instabil. Procesul de polimerizare se poate datora atât unei concentrații mari a GlyD, cât și mediului bazic oferit cu generozitate de matricea glicerolului rezidual din procesul biodiesel (procesul biodiesel se desfășoară în prezența catalizatorilor de tip bazic). Aceste teste s-au efectuat după aceeași procedură tipică, ca și în etapele prezentate anterior: 0.1 g Gly rezidual, 1 ml DMC, 200 μl biocatalizator bifuncțional, 1 ml ciclohexan, 80°C, 24 de ore, sub agitare.

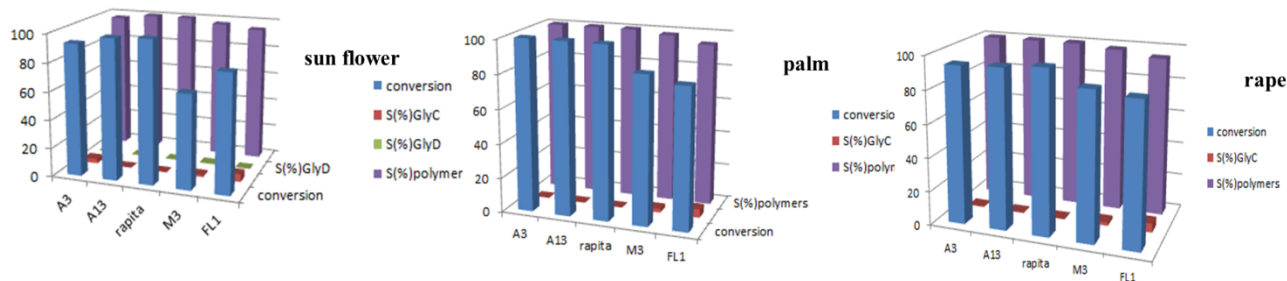


Figura 5. Investigarea biocatalizatorilor în transformarea glicerolului rezidual obținut în procesul biodiesel al uleiului.

Spre deosebire de probele pe baza glicerolului pur, aceste probe de reacție cu glicerol rezidual nepurificat indică importanța efectului conținutului de impurități din matricea de la care se pornește, și anume bazicitatea matricii de glicerol favorizează formarea polimerilor. Ca o remarcă generală a acestei etape experimentale, se observă faptul că protocolul privind pre-tratamentul glicerolului rezidual trebuie ales în mod empiric și în conformitate cu conținutul de impurități din matricea acestuia pentru obținerea unor rezultate bune.

Construirea sistemului biocatalitic în flux - partea a II-a

Sistemul biocatalitic în flux dedicat conversiei glicerolului în prezența lipazei conține următoarele elemente prezentate schematic în figura 6: pompă peristaltică, reactor enzimatic și cutie cu site moleculare; toate elementele sunt conectate prin tubulatura PTFE. Reactorul enzimatic este umplut cu biocatalizator heterogen sub formă de lipază imobilizată pe suport solid (particule de silice provenite de la firma Purolite). Imobilizarea enzimei pe suport solid s-a realizat cu ajutorul legăturilor covalente enzimă-suport. Filtre HPLC atașate la partea de *inlet* și *outlet* a reactorului permit menținerea biocatalizatorului în interiorul reactorului în ciuda fluxului continuu de lichid care circulă prin sistem. Reactorul enzimatic este acoperit în exterior de un manșon termostatat care permite menținerea unei temperaturi constante în interiorul reactorului pe toată lungimea acestuia.

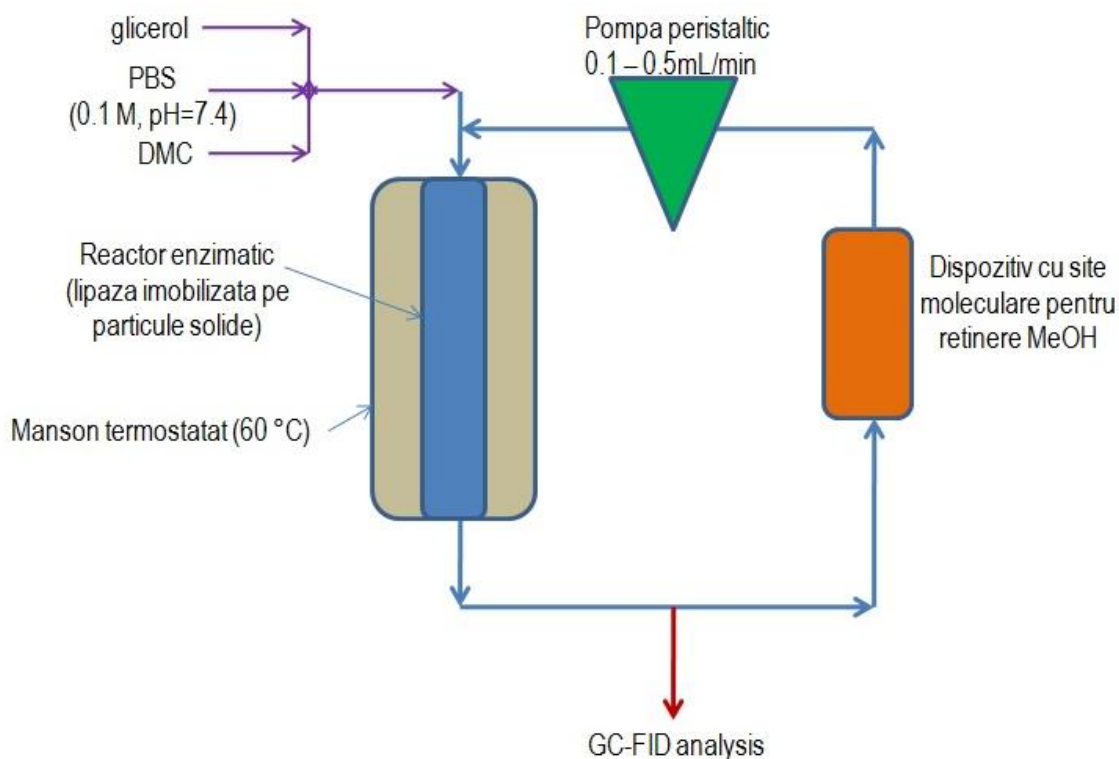


Figura 6. Sistem biocatalitic în flux pentru sinteza GlyC din glicerol rezidual provenit din industria biodiesel.

Amestecul de reacție se realizează prin amestecarea glicerolului, DMC și PBS în regim *offline*. Se încearcă o omogenizare cât mai corectă a amestecului. Acesta este introdus în sistem cu ajutorul pompei peristaltice. Tot aceasta asigură un flux continuu și circular în interiorul sistemului. În acest fel se oferă posibilitatea amestecului de reacție de a trece prin reactorul enzimatic de mai multe ori. Prezența dispozitivului cu site moleculare asigură stocarea MeOH. În acest fel, MeOH este eliminat din amestecul de reacție deplasând echilibrul procesului către formare de noi produși de reacție. Este o modalitate eficientă de a îmbunătăți randamentul sistemului biocatalitic. Totodată, se elimină riscul inhibiției enzimatic realizată de prezența MeOH. După consumarea timpului de reacție, amestecul reacționat este colectat și analizat cu ajutorul sistemului GC-FID, așa cum este descris anterior pentru cazul reacției *în batch*.

Optimizarea sistemului biocatalitic în flux - partea a II-a

Experimentele de laborator care au avut în vedere optimizarea sistemului biocatalitic au urmărit: influența timpului de reacție asupra procesului, viteza fluxului prin sistem, raportul dintre reactanți, raportul acestora față de PBS, adaos sau nu de solvent organic, stoparea fluxului de reactanți în interiorul reactorului enzimatic, diametrul tubulaturii de legătură în sistem. Au fost testați, pentru același flux, mai mulți timpi de reacție (6, 12, 24 și 48 ore). Timpul de reacție presupune timpul în care proba este deplasată prin sistemul circular. Conversia glicerolului crește o dată cu timpul de reacție. Dacă în cazul timpului de 6h avem o conversie de

31 %, după 12h conversia atinge 45 %; mai apoi, creșterea este încetă, conversia are valoarea de 53 % după 12h și 56 % după 24h. Din aceste rezultate se observă faptul ca un timp de reacție de 12h este justificabil în termen de conversie. Deja între 12 și 24h, conversie crește doar cu câteva procente, ceea ce nu justifică prelungirea timpului de reacție. Aceste teste s-au realizat pentru un flux de 0.3 mL/min.

Viteza fluxului prin sistem a fost variată în intervalul 0.1 -0.5 mL/min. Pentru viteze mici de reacție de 0.1-0.3 mL/min se observă o creștere continuă a conversiei. În general, viteze mici de flux favorizează conversia deoarece reactanții sunt păstrați în contact direct cu enzima pe o perioadă mai lungă. Totuși, în cazul sistemului circular, creșterea vitezei de reacție permite recircularea de un număr mai mare de ori și, eliminarea eficientă a MeOH prin adsorbție în sitele moleculare. Creșterea în continuare a vitezei de reacție către 0.5 mL/min duce la o scădere lentă a conversiei. Acest comportament se datorează unui timp scurt de contact între enzimă și amestecul de reacție.

Raportul dintre reactanți a fost menținut același ca și în cazul reacției în *batch* (glicerol:DMC=1:10). A fost adăugat un volum controlat de soluție PBS (0.1 M, pH=7.4) pentru a asigura compoziția optimă de molecule de apă necesare funcționării lipazei. Deoarece în modelul *batch* s-a utilizat un volum de 100 μL soluție PBS în care se găsea dizolvată enzima, același volum soluție PBS a fost menținut și în cazul sistemului în flux. S-a observat că în absența soluției PBS conversia glicerului este mai mică (38 %).

Prezența solventului organic de tip ciclohexan sau THF influențează sistemul biocatalitic, așa după cum s-a demonstrat în experimentele anterioare. Pentru sistemul în flux, solventul organic nu prezintă un efect consistent, de aceea experimentele realizate nu vor fi detaliate.

Testarea glicerolului rezidual în sistemul biocatalitic construit - partea a II-a

Experimentele realizate în etapa II/2015 au pus în evidență faptul că în cazul glicerolului rezidual comportamentul sistemului este diferit față de glicerolul standard. S-a presupus că există un efect de matrice reprezentat de influența MeOH și a H₂O asupra sistemului biocatalitic. Pentru a demonstra această supoziție, s-au realizat experimente în care amestecul de reacție a conținut, pe lângă compoziția bine-cunoscuta, si adaus de MeOH, respectiv H₂O.

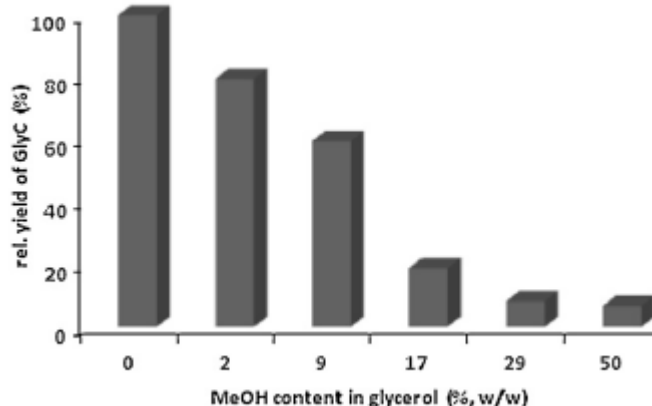


Figura 7. Influența MeOH asupra sintezei biocatalitice a GlyC.

În figura 7 sunt prezentate datele experimentale obținute prin adăugarea MeOH în sistem. Se observă că MeOH inhibă în general transformarea glicerolului în GlyC. Pentru doar 2 % (w/w) avem o inhibiție de 20% a lipazei. Activitatea lipazei se rezumă la doar 20% randament recuperat față de valoarea inițială (0% MeOH) atunci când compoziția amestecului este de 17 % MeOH.

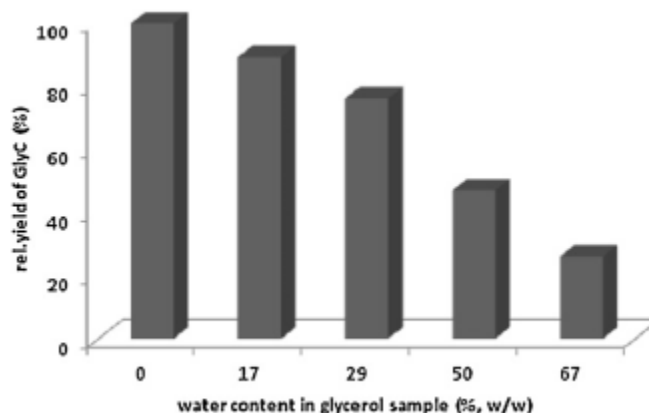


Figura 8. Influența H₂O asupra sintezei biocatalitice a GlyC.

Figura 8 conține datele experimentale realizate în prezența unui adăug de H₂O. În sistemul nostru există H₂O datorită adăugării soluției enzimice. Prin adăugarea unui nou volum de apă se observă cum randamentul în GlyC scade treptat împreună cu creșterea conținutului de H₂O. Efectul H₂O față de MeOH este mult mai lent. Astfel, același procent de 17%, dar în acest caz de H₂O provoacă o scădere cu numai 10% a randamentului în GlyC. Efectul H₂O poate avea două aspecte: i) glicerolul se acomodează ușor în apă, iar noua fază formată vine și acoperă enzima închizând calea de acces a DMC către centru catalitic; ii) GlyC este sensibil în prezența H₂O și poate da reacția inversă de hidroliză cu deschiderea ciclului. Astfel, se pierde GlyC din sistem. Deci, au fost demonstrate ipotezele în baza cărora atât MeOH cât și H₂O influențează sistemul biocatalitic dezvoltat. În baza acestor observații glicerolul rezidual a fost pre-tratat prin expunere la temperatură în condiții de vid. În acest fel s-a înlăturat eventualul conținut de MeOH și H₂O existent în probele de glicerol.

Proiectarea și construirea instalației pilot

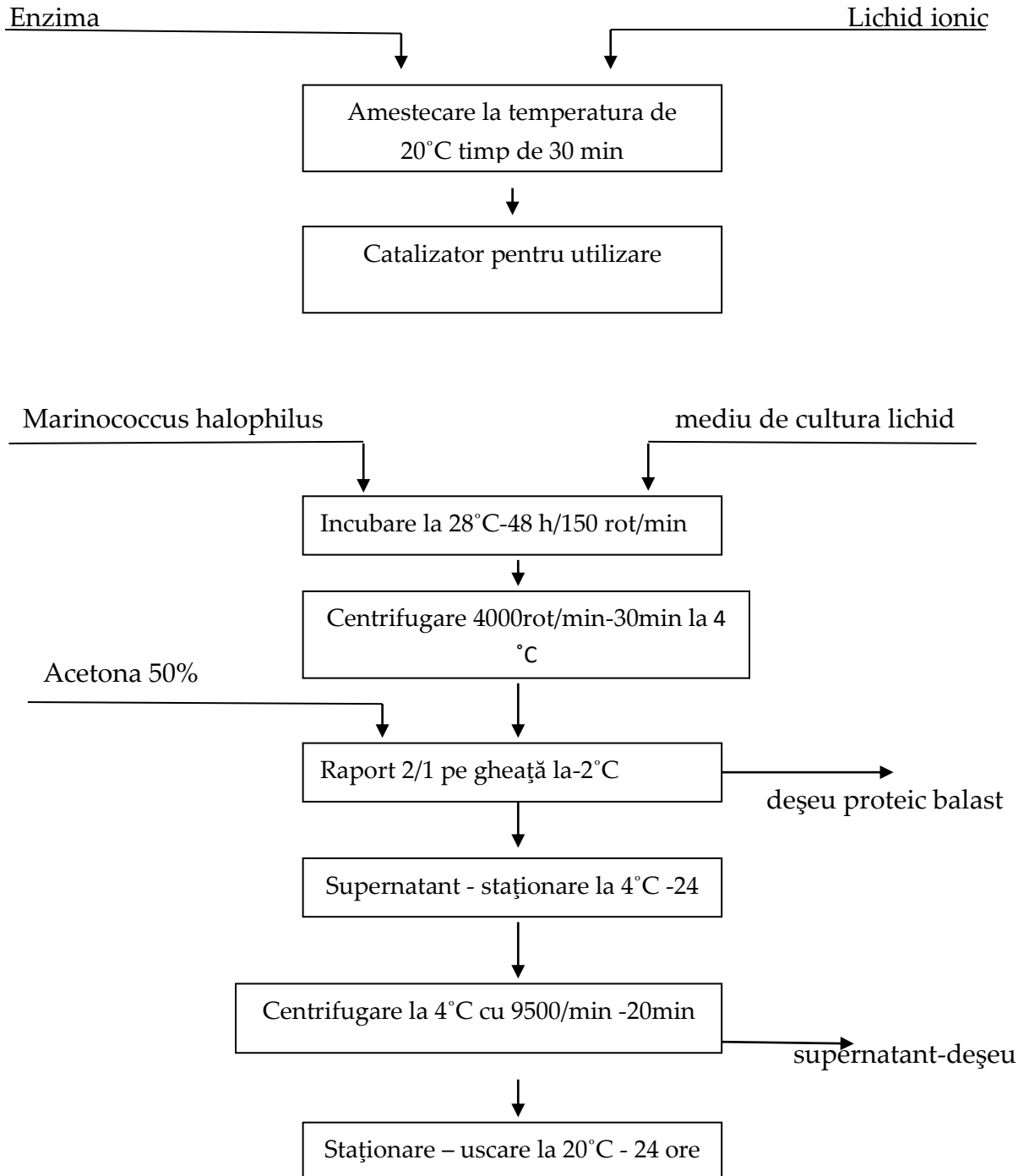
Instalația pilot reproduce toate fazele tehnologice care s-au derulat în laborator, ca urmare se vor aborda în succesiunea firească aplicată în laborator și considerată optimă. Această succesiune implică următoarea programare de faze:

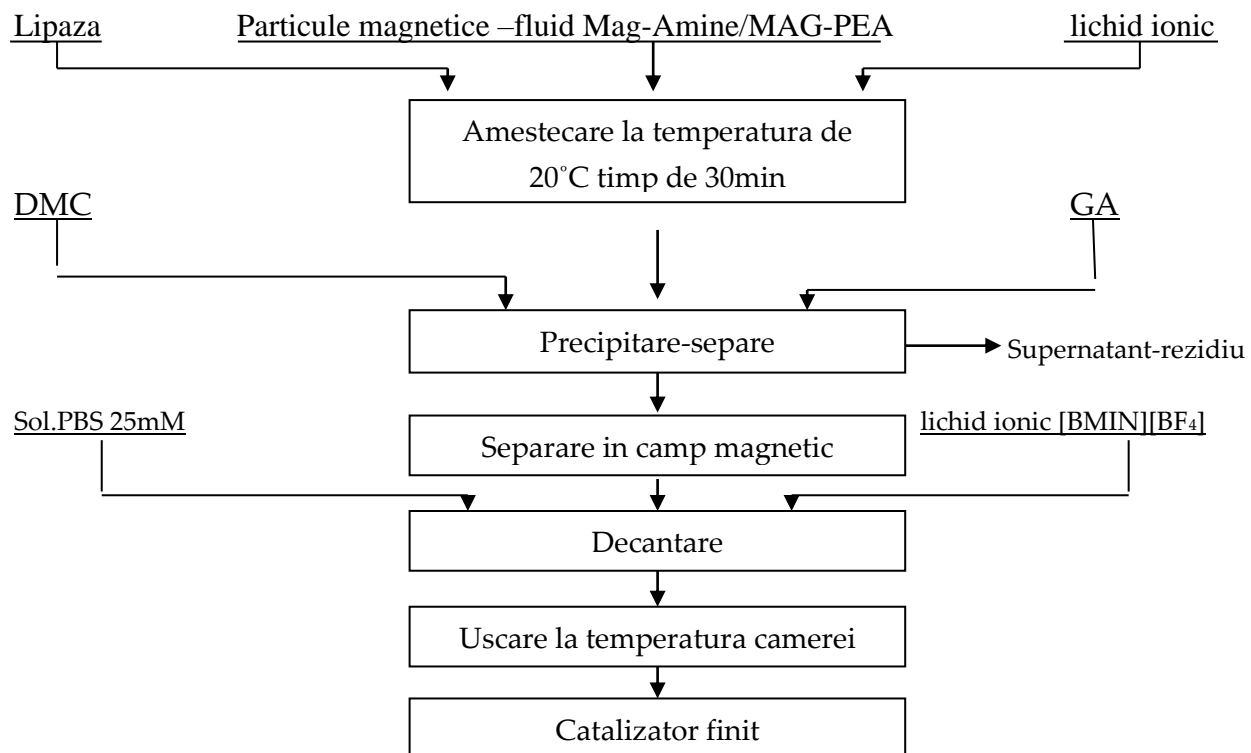
- 1- Purificarea enzimelor
- 2- Prepararea catalizatorului dual
- 3- Imobilizarea enzimelor pe particule magnetice /lichid ionic
- 4- Obținerea carbonatului de glicerol și a glicidolului.

Proiectarea și adaptarea sistemului biocatalitic la instalația pilot este soluționată prin integrarea sistemului de obținere a biocatalizatorilor ca fază distinctă a tehnologiei biochimice de transformare a glicerolului în glicerol carbonat și respectiv în glicidol.

Purificarea enzimelor cu activitate catalitică în condiții de halofilie/ Imobilizarea catalizatorului pe matrice de lichid ionic/ Imobilizarea catalizatorului în sistem CLEMPA

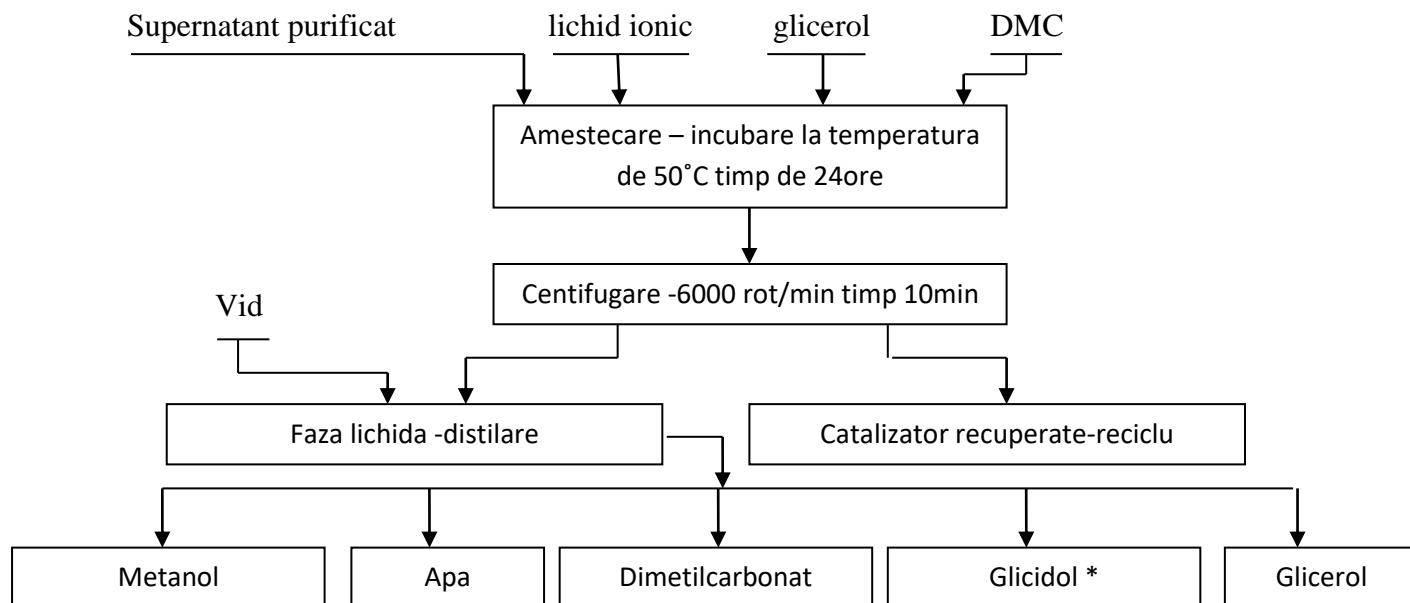
Obținerea biomasei cu conținut enzimatic de interes prin cultivarea tulpinii halotolerante presupune o temperatură de incubare de 28°C, o viteză de agitare de 150 rot/min, timp de cultivare de minim 48 ore și o concentrație de NaCl de 10%. Prima treaptă de purificare parțială a enzimelor de interes se face prin precipitare și separare cu acetonă la rece, urmată de centrifugare.





Obținerea glicidolului din glicerol

Conform tehnologiei de laborator elaborate succesiunea operațiilor pentru obținerea glicidolului prin carbonat este următoarea:



*în locul acestuia poate fi carbonatul de glicerol

Proiectarea instalației pilot

Raportul de activitate prezentat în cursul anului 2015 arată că experimentările de laborator s-au făcut într-o instalație care se obține conform recepturii dintr-o cantitate de :

- 100 μ L biomasă (200 μ L în cazul supernatanților)
- glicerol – 0,1g
- dimetilcarbonat 1mL
- catalizator: format din enzimă și particule de SiO₂ de 100-500 nm (50mg enzimă + 50mg SiO₂)

Compoziția chimică a amestecului de sinteză:

- biomasă 100 μ L x 1 = 0,1g
- glicerol : 0,1g
- dimetilcarbonat 1x1,069 =1,069

Compoziția amestecului de sinteză în cazul acesta este în g și cm³ după cum urmează :

Nr.crt	Component conf. recepturii	Cantitati în g		Cantitati în cm ³	
		g	%	cm ³	%
1	Lichid ionic	0,0625	5,0751	0,1	8,3333
2	Glicerină	0,1	8,1202	0,1	8,3333
3	DMC	1,069	86,805	1,000	83,3333
	Total	1,2315	100,00	1,200	100,00
1'	Supernatant*	0,200	14,6092	0,200	15,6323
2'	Glicerină	0,100	7,3046	0,0794	6,2060
3'	Carbonat de glicerol	1,069	73,0460	1,000	78,1616
	Total	1,369	100,00	1,2794	100,00

*amestec de lichid ionic supernatant 1: 2

Conform datelor de laborator în baza cărora s-a efectuat proiectarea conversia maximă a fost de 86% în carbonat de glicerină cu o selectivitate de 90%. Sistemul biocatalitic optimizat în flux a permis obținerea unor rezultate similare și pe instalație.

Prepararea mediului de cultură

Intr-un vas de reacție prevăzut cu agitator electric și manta de încălzire/răcire se dizolvă succesiv într-un litru de apă următoarele substanțe: - extract de drojdie 10g; proteoza- peptoza 5g; glucoza 1g, NaCl 100g; MgCl₂x6H₂O 7g; MgSO₄x7H₂O 9,6g; CaCl₂x2H₂O 0,36; KCl 2g; NaHCO₃ 0,06g ; NaBr 0,026 g.

Prepararea și purificarea lipazelor

O cotă parte din acest mediu (50ml) a fost preluată și suplimentată cu 1,5% glicerol rezidual provenit din folosirea de ulei de floarea soarelui pentru obținerea de

biodiesel și 1,5% glicerol rezidual (materia primă - ulei de masline), căreia s-a adăugat apoi 2,5ml de cultură bacteriană, s-a incubat la 28°C sub o agitare de 150 rot /min timp de 48 ore. Se centrifughează amestecul 30 minute la o turație de 4000 rot/min. Lichidul obținut conține extractul de interes și se supune purificării prin precipitare în două etape, în prima I, cu acetonă de 50% și în a doua II cu 80% , la temperatura maximă de 4°C și minimă de -2°C în raport de 2:1 acetonă/extract. După precipitare și separarea I, se face o a doua precipitare cu acetonă de 80% a supernatantului, care se lasă timp de 24 ore la frigider, după care se separă pe centrifugă la o turație de 9500 rot/min timp de 20 minute. Se îndepărtează supernatantul și se uscă pudra acetonică timp de 60 minute la temperatura ambiantă.

Imobilizarea catalizatorului pe matrice de lichid ionic

Așa după cum rezultă din tehnologia de laborator această fază constă în omogenizarea într-un vas sub agitare timp de 30 minute la temperatura ambiantă a enzimei selectate cu lichidul ionic.

Imobilizarea catalizatorului în sistem CLEMPA

Această fază așa după cum rezultă din tehnologia de laborator, constă în omogenizarea într-un vas sub agitare timp de 30 minute la temperatura ambiantă a enzimei selectate cu lichidul ionic, a particulelor magnetice – fluid Mag - Amine/MAG-PEA, după care în acesta se introduce DMC și GA, când se formează un precipitat polimeric care se separă magnetic prin decantare și filtrare, supernatantul nu prezintă interes și este un rezidu și se îndepărtează, iar peste precipitatul reținut magnetic se adaugă soluție PBS 25mM și lichid ionic [BMIN][BF₄] se decantează și se uscă la temperatura camerei. Produsul uscat este catalizatorul de interes.

Obținerea carbonatului de glicerină și a glicidolului din glicerol

S-a adaptat același sistem constituit dintr-un reactor biocatalitic cu agitare și termostatare, iar biocatalizatorul s-a imobilizat într-o matrice minerală, în funcție de ce variantă se dorește să se realizeze la scara de pilot. Dacă volumele în cercetările de laborator au atins valori între 1,2-1,3cm³ mărind de 2500 ori pilotul se va ajunge la 3,00 - 3,25 litri volum util, care la un grad de umplere de 70 -75% conduce la un volum total de 4,29 - 4,64 l. Se propune ca instalația să fie echipată cu un reactor de 5 l volum total. Schema instalației este conformă cu fluxul și succesiunea fazelor tehnologice prezentată mai sus, fiind formată de fapt din 4 instalații, care în ordinea prezentării conduc la o instalație complexă pentru obținerea tuturor subproduselor intermediare sau auxiliare. Pe baza datelor din referatul din 2015 s-a făcut trecerea la scară și s-au estimat rezultatele probabile pe instalația astfel construită.

Receptura de lucru

În baza acestei descrieri rezultă următoarea schemă tehnologică pentru o instalație pilot

-lichid ionic	312,4875.	8,3333%vol
-glicerină	312,4875	8,3333%
-DMC	3125,0250	83,3333%
Σ	3750,000	100.00

Aceasta conduce la o greutate de:

-lichid ionic	351.5484	8,6030
-glicerină	394.1405	9,6453
-DMC	3340,6517	81,7517
Σ=	4086,3406	100.0000

Conform datelor de laborator în baza cărora s-a efectuat proiectarea conversia maximă a glicerinei este de 86% în carbonat de glicerină cu o selectivitate de 90%.

Conform reacției va rezulta următoarea compoziție cantitativă și procentuală a procesului:

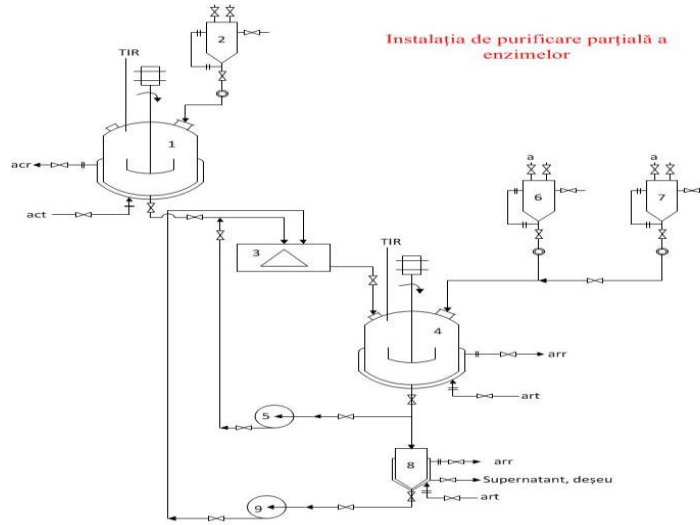
-apa*	(poate proveni din fluidul ionic)	
-metanol	235,8628	5,7720
-lichid ionic	351, 5484	8,6030
-glicerină	55, 1797	1,3503
-DMC	3009,0892	73,6377
-carbonat de glicerină	434,6605	10,6369
Σ=	4086,3406	99,9999

Similar se prezintă situația și în cazul obținerii glicidolului din carbonatul de glicerină. Diferența fiind numai între valoarea conversiei și a selectivității catalizatorului dual folosit și faptul că receptura este diferită folosind:

-supernatant	500,0060	15,3848
-lichid ionic	250, 0000	7,6924
-carbonat de glicerina	250,0000	7,6924
-tetrahidrofuran	2249,9994	69,2308
Σ=	3250,00	100,0000

Conversia carbonatului de glicerină în glicidol este de 70% iar selectivitatea numai de 55% ca atare și compoziția rezultată va fi puțin diferită.

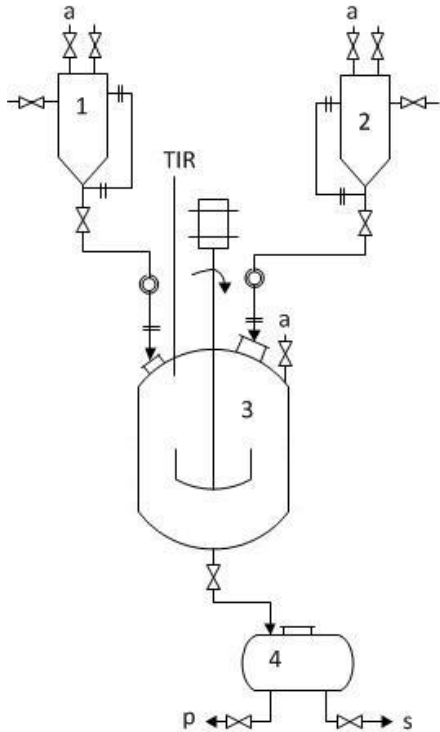
Instalația de purificare parțială a enzimelor



Legenda:

- | | | |
|--|---|--|
| 1 – vas de incubare, termostatat la 28°C -37°C | 5 - pompă de vehiculare - peristaltică sau cu șurub | a - Robinet de aerisire |
| 2 – vas de dozare tulpina bacteriană | 6 – vas dozare acetona 50 % | arr- agent răcire tur |
| 3 – centrifugă cu 4000 – 9500 rot/min | 7 – vas dozare acetona 80 % | act- apă caldă tur |
| 4 – vas precipitare proteine | 8 – vas florentin răcit | acr- apă caldă retur |
| | 9 – pompă de vehiculare - peristaltică sau cu șurub | TIR -inregistrator și indicator de temperatură |

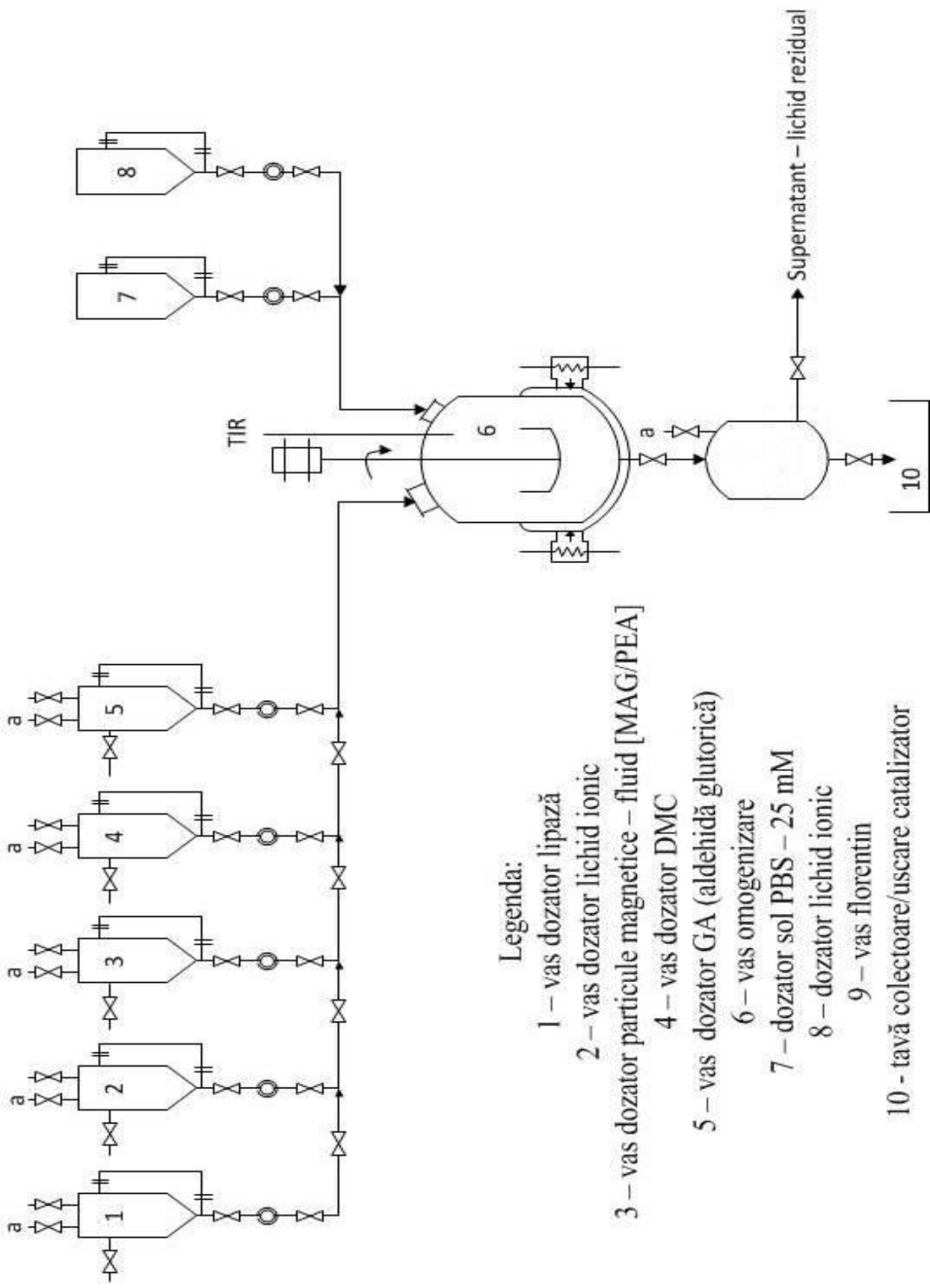
Instalația de imobilizare a catalizatorului pe matrice de lichid ionic



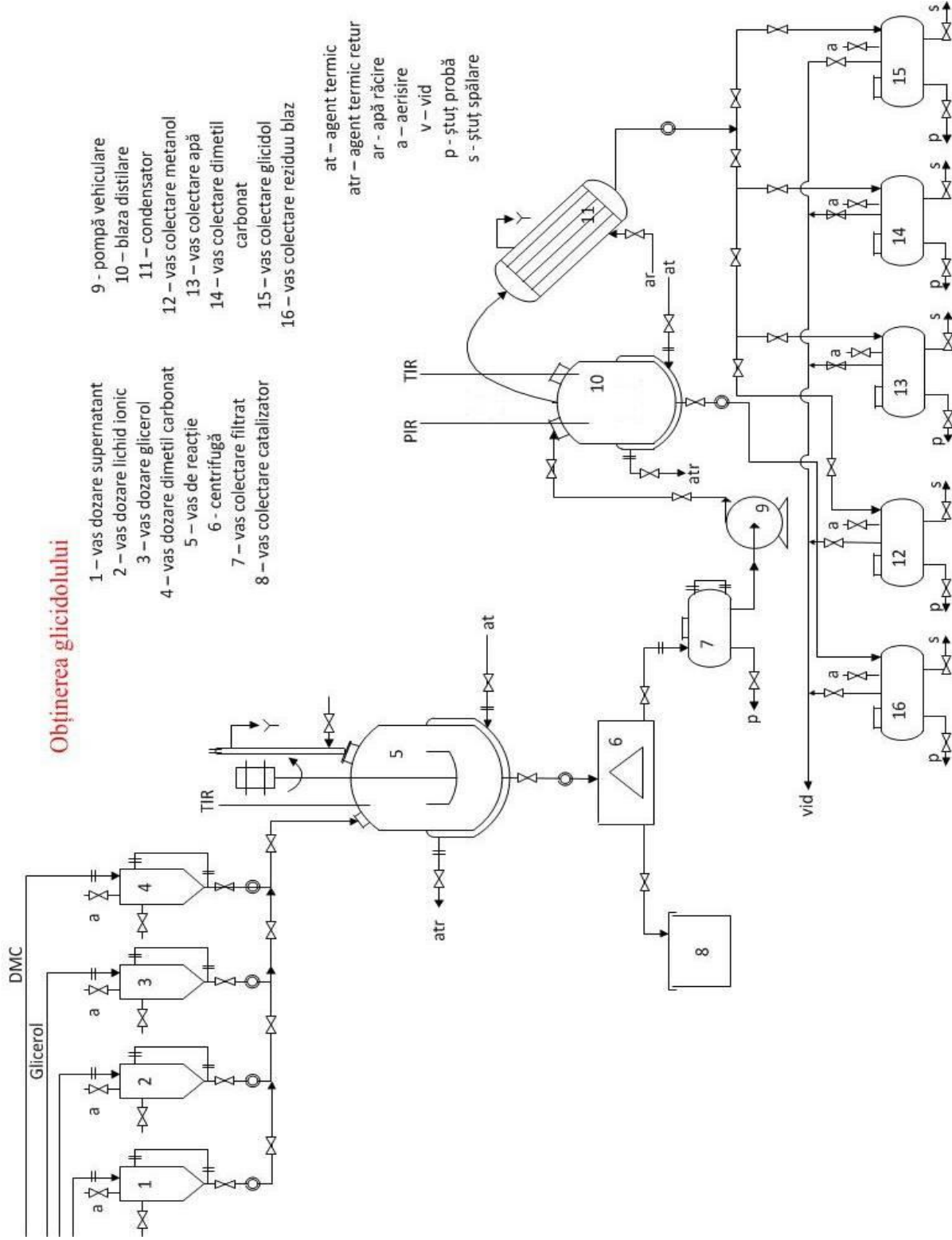
Legenda:

- 1 – vas dozare enzimă
- 2 – vas dozare lichid ionic
- 3 – omogenizator
- 4 – vas stocare catalizator
- a – aerisire
- p – probĂ
- s – spălare

Instalația de imobilizare CLEMPA



Obținerea glicidolului



- 1 – vas dozare supernatant
- 2 – vas dozare lichid ionic
- 3 – vas dozare glicerol
- 4 – vas dozare dimetil carbonat
- 5 – vas de reactie
- 6 - centrifugă
- 7 – vas colectare filtrat
- 8 – vas colectare catalizator
- 9 - pompă vehiculară
- 10 – blaza distilare
- 11 – condensator
- 12 – vas colectare metanol
- 13 – vas colectare apă
- 14 – vas colectare dimetil carbonat
- 15 – vas colectare glicidol
- 16 – vas colectare reziduu biaz

at – agent termic
 atr – agent termic retur
 ar - apă răcire
 a – aerisire
 v – vid
 p - ștuț probă
 s - ștuț spălare

Schema instalației pilot proiectate pentru sinteza carbonatului de glicerină și a glicidolului prezentată mai sus permite verificarea la scară mărită 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 constituenții chimici – respectiv materiile prime care sunt depozitate în acestea, în vasele de dozare aferente și plasate în poz.1-4. Parcul de rezervoare de zi și pompele aferente nu sunt prezentate în schemă. Din aceste vase de dozare se dozează conform recepturii 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 blaza din poz.10, blază care de fapt poate fi un distilator rotativ sub vid. Vaporii sunt condensați în răcitorul 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 glicerină, glicidol, glicerină și (eteri, polieteri ai glicerinei-blaz). Urmele de apă pot ieși împreună cu metanolul.