



ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI

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

Se aprobă,
Director,
Acad. Octavian Popescu

Raport științific și tehnic al etapei 2 – 2015 - 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 2:

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

Sef department,

Acad. Octavian Popescu

Director proiect,

dr.Mădălin Enache

Etapa 2 – Biocatalizatori – sistemul biocatalitic

- Activitatea 2.1. – Purificarea enzimelor de interes (lipaze, esteraze, decarboxilaze) și caracterizarea acestora pe baza cineticii enzimatică - Partea I – CO
- Activitatea 2.2. – Selectarea enzimelor (lipaza și decarboxilaza)- Partea I -P1
- Activitatea 2.3. – Prepararea biocatalizatorului cooperativ-dual - Partea I – P1
- Activitatea 2.4. – Construcția sistemului biocatalitic în flux - Partea I – P1
- Activitatea 2.5. - Optimizarea sistemului biocatalitic în flux - Partea I – P1
- Activitatea 2.6. – Testarea glicerolului rezidual în sistemul biocatalitic - Partea I – P1
- Activitatea 2.7. – Obținerea glicerolului rezidual - Partea I – P2
- Activitatea 2.8. - Obținerea glicerolului rezidual - Partea II – P2

Activitatea consorțiului în cursul etapei II (2015) a proiectului BioGlyCat s-a desfășurat în cadrul a opt activități experimentale generice (una aferentă CO, cinci aferente P1 și două aferente P2) care au permis punerea la punct a unui sistem biocatalitic bazat pe biocatalizator dual, pentru convertirea glicerolului în glicerol carbonat (GliC) și glicidol (GliD). Rezultatele experimentale, cât și interpretarea acestora sunt detaliate în cadrul prezentului raport.

Activitatea 2.1. - Purificarea enzimelor de interes (lipaze, esteraze, decarboxilaze) și caracterizarea acestora pe baza cineticii enzimatică –partea I

În cadrul acestei etape au fost aplicate metode de purificare parțială a unor preparate lipolitice/esterazice și caracterizarea acestor preparate prin determinarea parametrilor optimi de activitate catalitică folosind ca sursă de exoenzime bacterii halofile/halotolerante. Dintr-un număr de 30 de tulpini de bacterii halofile izolate din probe de apă, prelevate din lacul sărat Balta Albă, județul Buzău și din lacul Techirghiol, au prezentat activitate lipolitică un număr de 8 tulpini de bacterii halofile/halotolerante. Pe baza datelor obținute în urma testării calitative în ceea ce privește capacitatea tulpinilor de a prezenta activitate hidrolitică (esterazică/lipazică), s-a trecut la o etapă ulterioară, care a vizat selectarea unei tulpini cu acțiune hidrolitică înaltă, 3-6. În studiu a fost introdusă și tulpina *Marinococcus halophilus* JCM2472, bacterie moderat halofilă, selectată ca fiind bună producătoare de lipaze/esteraze și decarboxilază.

Inoculul bacterian s-a obținut pe mediul de cultură MH lichid, care conține (g/L): yeast extract, 10; proteose peptonă 5; glucoză 1; NaCl, 100; MgCl₂x6H₂O, 7; MgSO₄x7H₂O, 9,6; CaCl₂x2H₂O, 0,36; KCl 2; NaHCO₃ 0,06; NaBr 0,026 (Ventosa și colab., 1972).

Parametri optimi de biosinteză pentru tulpina halotolerantă 3-6 izolată din lacul sărat Balta Albă au fost: temperatura de incubare 28°C, viteza de agitare 150 rpm, timp de incubare 48 h și o concentrație optimă de 10% NaCl (1.7M). *Marinococcus halophilus* se dezvoltă optim la 37°C, 120 rpm, timp de incubare 48h și necesită pentru creștere o concentrație de NaCl cuprinsă între 5%-10%.

Pentru bacteria moderat halofilă a fost necesară selectarea unui mediu de cultură care să contribuie la îmbunătățirea producției de enzimă extracelulară. Astfel, au fost pregătite patru medii sintetice cu următoarea compoziție chimică (g/L):

- 1) MH 5% NaCl: yeast extract, 10; proteose peptonă 5; glucoza 1; NaCl, 50; MgCl₂x6H₂O, 7; MgSO₄x7H₂O, 9,6; CaCl₂x2H₂O, 0,36; KCl 2; NaHCO₃ 0,06; NaBr 0,026 (Ventosa și colab., 1972)
- 2) MH 10% NaCl: yeast extract, 10; proteose peptonă 5; glucoza 1; NaCl, 100; MgCl₂x6H₂O, 7; MgSO₄x7H₂O, 9,6; CaCl₂x2H₂O, 0,36; KCl 2; NaHCO₃ 0,06; NaBr 0,026 (Ventosa și colab., 1972)
- 3) R-AGAR 5% : Bacto peptone, 10; yeast extract, 5; malt extract, 5; casamino acids, 5; beef extract, 2; glycerol, 2; Tween 80, 0.05; NaCl, 50; MgSO₄x7H₂O, 1
- 4) R-AGAR 10% : Bacto peptone, 10; yeast extract, 5; malt extract, 5; casamino acids, 5; beef extract, 2; glycerol, 2; Tween 80, 0.05; NaCl, 100; MgSO₄x7H₂O, 1

Datele obținute au arătat faptul că tulpina se dezvoltă optim pe mediu MH cu 5% și 10% NaCl. Pentru etapele următoare s-a utilizat mediul MH cu 10% NaCl pentru dezvoltarea celulară și sinteza de enzime lipolitice.

Variația în timp a creșterii celulare pentru Marinococcus halophilus pe diferite medii sintetice

Densitatea optică 660 nm				
	16h	22h	40h	96h
MH 5% NaCl	0.476	0.880	1.224	2.883
MH 10% NaCl	0.386	0.800	1.116	2.803
R-agar 5%	0.163	0.172	0.168	0.243
R-agar 10%	0.148	0.402	0.98	1.228

De asemenea, s-a încercat favorizarea biosintezei lipazelor prin suplimentarea mediului de cultură cu diferite uleiuri comerciale în concentrație de 1.5%. Astfel, s-a folosit un volum de 50 ml mediu MH, suplimentat cu ulei de măsline 1.5%, respectiv floarea soarelui 1.5%, care se inoculează cu 2.5 ml cultură bacteriană lichidă proaspătă. Mediul astfel inoculat a fost incubat la temperaturile optime de creștere pentru tulpinile selectate, în condiții de agitare. S-a urmărit variația în timp a creșterii celulare (spectrofotometric, 660 nm) și a activității lipolitice extracelulare. Pentru determinarea activității lipolitice, se preiau și se centrifughează câte 10 ml cultură bacteriană la același interval de timp la care s-au realizat determinările spectrofotometrice. Metoda titrimetrică descrisă de Willstätter, cu unele modificări, a fost folosită pentru determinarea activității lipolitice. Amestecul de reacție, format din 5 ml ulei măsline/ulei floarea soarelui, 2 ml deoxicolat de sodiu 2%, 1 ml BSA 0.05%, soluție salină NaCl 10%, 2 ml extract enzimatic, a fost incubat pentru 30 minute la 37°C. Reacția a fost stopată prin adăugarea a 10 ml etanol 96%. Cantitatea de acizi grași eliberată a fost neutralizată cu NaOH 0.05 N, în prezență de fenolftaleină 1%. S-a folosit și o probă martor, tratată în aceleași condiții, la care reacția a fost stopată cu 10 ml etanol 96% înainte de a adăuga extract enzimatic.

Monitorizarea dezvoltării celulare și a activității hidrolazice extracelulare la tulpina halotolerantă 3-6 și bacteria moderat halofilă Marinococcus halophilus folosind diferite uleiuri comerciale 1.5%

Tulpina	D.O _{660nm} T ₀	D.O _{660nm} T _{4h}	AE _{4h} μmol/ml ·min	D.O _{660nm} T _{24h}	AE _{24h} μmol/m l·min	D.O _{660nm} T _{48h}	AE _{48h} μmol/ml ·min	D.O _{660nm} T _{72h}	AE _{72h} μmol/ml· min
<i>M.halophilus</i> +ulei măsline	0,178	0,240	0,91	0,555	1	1,082	0,83	2,661	0,58
<i>M.halophilus</i> +ulei fl.soarelui	0,170	0,187	0,83	1,064	1,5	1,649	0,83	2,250	0,58
3-6 +ulei măsline	0,188	0,218	0,75	1,743	1	2,242	0,67	2,077	0,58
3-6 +ulei fl.soarelui	0,190	0,212	0,75	1,575	1,5	1,597	1,08	2,963	0,66

Rezultatele obținute au permis alegerea substratului potrivit în sinteza enzimei lipolitice extracelulare. Astfel, pentru biosinteza enzimei de către bacteria moderat halofilă *Marinococcus halophilus* s-a folosit ca substrat uleiul de măsline 1.5%, iar pentru tulpina halotolerantă, substratul utilizat pentru producerea de lipaze a fost uleiul de floarea soarelui 1.5%.

Purificarea enzimelor de interes (lipaze/esteraze)

I. Purificarea parțială a lipazei extracelulare bacteriene

A. Precipitarea fracționată cu acetonă

După dezvoltarea culturii bacteriene și biosinteza enzimei de interes, lichidul de cultură a fost centrifugat la 4000 rpm, 4°C, timp de 30 minute, obținând extractul enzimatic brut. Acesta a fost supus unei purificări parțiale prin precipitare fracționată cu acetonă 50% și 80%. Această etapă de precipitare a proteinelor cu solvent organic se realizează la temperaturi sub 4°C, pe gheață, raportul acetonă: extract enzimatic fiind de 2:1. Acetona se adaugă treptat, sub agitare continuă, având grijă ca temperatura să nu depășească -2°C. Precipitatul obținut după adăugarea de acetonă 50% conține proteine balast și au fost îndepărtate prin centrifugare la 9500 rpm, 4°C, 20 minute, după care, în supernatant se adaugă din nou acetonă cu concentrația de 80% și se lasă la frigider timp de 24h pentru precipitarea proteinelor. Noul precipitat se separă prin centrifugare la 4°C, 9500 rpm, 20 minute. Se aruncă supernatantul și se păstrează pudra acetonică, care după uscare la temperatura camerei timp de 60 minute va fi suspendată într-un volum de 10 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Volumul de supernatant luat în lucru a fost de 50 mL.

B. Cromatografia de gel filtrare

Extractul proteic parțial purificat se supune purificării prin gel filtrare în porțiuni de câte 1 mL. Pentru aceasta, se pregătește coloana prin spălarea acesteia în prealabil cu apă milliQ și etanol 96%. Aceasta se încarcă cu 2 mL de gel obținut prin hidratarea a 2g de copolimer BioGel P-Biorad P100 cu 50 mL apă milliQ, timp de 12h, la 20°C. Echilibrarea se realizează cu soluție tampon Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, ce conține EDTA 0.003M și β -mercaptoetanol 0.001M. Eluția se face cu Tris-HCl 0.1M, 0.2M, 0.5M și 1M, pH 7.5, în trei repetiții pentru fiecare concentrație. Se determină în fiecare fracțiune concentrația proteică prin metoda Lowry și activitatea enzimatică, prin metoda titrimetrică descrisă de Willstatter, cu unele modificări. Activitatea specifică s-a exprimat ca $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$ proteină.

Etapile de purificare ale enzimei lipolitice sintetizate de Marinococcus halophilus

Nr. crt.	Etapă de purificare	Concentrația proteică (mg/mL)	Activitatea specifică ($\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$)
1	Filtrat de cultură	84,58	0,052
2	Precipitare cu acetonă 50%	28,55	0,175
3	Precipitare cu acetonă 80%	6,89	0,769
4	Gel filtrare	0,58	9,65

Etapile de purificare ale enzimei lipolitice sintetizate de tulpina halotolerantă 3-6

Nr. crt.	Etapă de purificare	Concentrația proteică (mg/mL)	Activitatea specifică ($\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$)
1	Filtrat de cultură	81,75	0,031
2	Precipitare cu acetonă 50%	26,47	0,195
3	Precipitare cu acetonă 80%	8,58	0,651
4	Gel filtrare	1,01	5,12

În continuare, s-a trecut la caracterizarea extractului purificat, în vederea determinării parametrilor optimi de activitate catalitică.

II. Stabilirea parametrilor fizico-chimici optimi de activitate catalitică

❖ Influența pH-ului asupra activității lipazice

Pentru a studia influența pH-ului mediului de reacție asupra activității enzimatică s-a determinat activitatea lipolitică în medii de reacție cu valori de pH cuprins între 4-10, celelalte condiții de incubare rămânând constante (37°C, 10% NaCl, 1.5% ulei de măsline/ulei floarea soarelui). Substratul a fost dizolvat în: tampon acid citric- Na_2HPO_4 0,1 M (pH 4-6), Tris-HCl 20 mM (pH 7-10).

Activitatea lipolitică a extractului purificat la diferite valori de pH ($\mu\text{moli}/\text{ml}\cdot\text{min}$)

pH	4	5	6	7	8	9	10
Tulpina							
<i>Marinococcus halophilus</i>	9,2	13,8	18,6	18,3	18	5,8	5
3-6	9,2	13,3	14,6	15,4	14,2	4,6	3,75

❖ Influența temperaturii asupra activității catalitice

În scopul stabilirii temperaturii optime de reacție a preparatului lipolitic purificat, acesta a fost incubat la diferite valori de temperatură cuprinse între 15-70°C, restul condițiilor de incubare rămânând constante.

Activitatea lipolitică a extractului purificat la diferite temperaturi ($\mu\text{moli}/\text{ml}\cdot\text{min}$)

Temperatura (°C)	15	20	30	40	50	60	70
Tulpina							
<i>Marinococcus halophilus</i>	3,3	3,3	3,6	3,3	3,6	4	3,6
3-6	3,6	3,3	4	3,6	4	3,6	3,6

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

În scopul determinării concentrației optime de NaCl pentru activitatea catalitică a celor două extracte lipolitice s-a variat concentrația de sare în mediul de reacție de la 0 la 3 M NaCl, celelalte condiții de incubare rămânând constante.

Activitatea lipolitică a extractului purificat la diferite concentrații de NaCl ($\mu\text{moli/ml}\cdot\text{min}$)

Concentrație NaCl (M)	0	1	1.7	3
Tulpina				
<i>Marinococcus halophilus</i>	3,3	3,3	3,3	5
3-6	4	3,3	11	3,6

❖ **Influența concentrației de substrat asupra activității catalitice**

Pentru determinarea concentrației optime de substrat în mediul de reacție s-au utilizat concentrații diferite ale substratului cuprinse între 0,5-2%, ceilalți parametri menținându-se la valorile optime. Datele obținute arată faptul că mărirea sau micșorarea concentrației de substrat nu îmbunătățește activitatea hidrolazică.

Activitatea lipolitică a extractului purificat la diferite concentrații ale substratului ($\mu\text{moli/ml}\cdot\text{min}$)

Tulpina/Conc. substrat (g%)	0,5	1,5	2
<i>Marinococcus halophilus</i>	3,6	3,6	3,6
3-6	2,6	2,6	2,6

Pentru că rezultatele obținute în etapa de caracterizare a preparatului enzimatic purificat, prin încercarea de a stabili parametrii optimi de activitate catalitică, nu au fost încurajatoare, s-au repetat experimentele de purificare a enzimei lipolitice, iar activitatea catalitică a fost determinată spectrofotometric, utilizând ca substrat p-nitrofenil butirat. Concentrația proteică s-a determinat prin metoda Lowry și s-a exprimat ca mg/mL.

Pentru determinarea activității enzimatice folosind ca substrat p-nitrofenilbutirat, amestecul de reacție este format din: 0.25 mL extract enzimatic, 0.65 mL Tris-HCl 0.005 M, pH 7.5, 0.1 mL 0.025M p-nitrofenilbutirat în etanol absolut, NaCl 1M. Mixul de reacție se incubează la temperatura de 37°C, 30 minute. Reacția este stopată cu 0.25 mL Na₂CO₃ 0.1M. Soluția este centrifugată pentru 2 minute, 12000g. p-nitrofenolul (pNP) eliberat sub acțiunea enzimei a fost observată spectrofotometric, la 410 nm față de un martor care a fost reprezentat de soluția de enzimă. O unitate de activitate a fost definită ca acea cantitate de enzimă care eliberează în condițiile date 1 μmol pNP într-un minut.

*Etapele de purificare ale enzimei lipazice sintetizate de *Marinococcus halophilus**

Nr. crt.	Etapă de purificare	Concentrația proteică (mg/mL)	Activitatea specifică (nmoli/min/mg)
1	Filtrat de cultură	86,72	0,124
2	Precipitare cu acetonă 50%	23,58	0,517
3	Precipitare cu acetonă 80%	20,49	0,625
4	Gel filtrare	0,75	13,77

Etapele de purificare ale enzimei lipazice sintetizate de tulpina halotolerantă 3-6

Nr. crt.	Etapă de purificare	Concentrația proteică (mg/mL)	Activitatea specifică (nmoli/min/mg)
1	Filtrat de cultură	60,21	0,151
2	Precipitare cu acetonă 50%	24,84	0,327
3	Precipitare cu acetonă 80%	11,55	0,409
4	Gel filtrare	2,9	3,68

❖ **Influența pH-ului asupra activității lipazice**

Pentru a studia influența pH-ului mediului de reacție asupra activității enzimatice s-a determinat activitatea lipolitică în medii de reacție cu valori de pH cuprins între 4-10, celelalte condiții de incubare rămânând constante (37°C, 10% NaCl, 1.5% ulei de măsline/ulei floarea soarelui). Substratul a fost dizolvat în: tampon acid citric-Na₂HPO₄ 0,1 M (pH 4-6), Tris-HCl 20 mM (pH 7-10).

Identificarea corectă a domeniului de pH în care enzima acționează prezintă o importanță deosebită. Hidroliza esterilor p-nitrofenolului pentru determinarea spectrofotometrică a activității enzimatice a lipazelor/esterazelor este limitată la domeniul bazic, ce nu este optim pentru toate enzimele. Pentru utilizarea metodei și în domeniul acid, se monitorizează eliberarea pNP spectrofotometric la 348 nm. În domeniul acid, p-nitrofenolul este incolor, cu maxim de absorbție la 317 nm, în timp ce, odată cu trecerea spre domeniul neutru al pH-ului echilibrul se deplasează spre formarea fenolatului, soluția se colorează în galben, cu un maxim de absorbție la 410 nm.

Activitatea lipolitică a extractului purificat la diferite valori de pH ($\mu\text{moli/h/mg}$)

pH	4	5	6	7	8	9	10
Tulpina							
<i>Marinococcus halophilus</i>	2,2	2,66	3,66	7,31	9	9	9
3-6	0,58	0,6	1,16	2,12	3,36	3,88	3,08

❖ **Influența temperaturii asupra activității catalitice**

În scopul stabilirii temperaturii optime de reacție a preparatului lipolitic purificat, acesta a fost incubat la diferite valori de temperatură cuprinse între 15-70°C.

Activitatea lipolitică a extractului purificat la diferite temperaturi ($\mu\text{moli/h/mg}$)

Temperatura (°C)	15	20	30	40	50	60	70
Tulpina							
<i>Marinococcus halophilus</i>	6,7	7,4	7,18	7,47	7,75	7,87	7,99
3-6	5,74	6,1	6,5	6,7	6,94	7,1	7,6

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

În scopul determinării concentrației optime de NaCl pentru activitatea catalitică a celor două extracte lipolitice s-a variat concentrația de sare în mediul de reacție de la 0 la 3 M NaCl, celelalte condiții de incubare rămânând constante.

Activitatea lipolitică a extractului purificat la diferite concentrații de NaCl ($\mu\text{moli/h/mg}$)

Conc. NaCl (M)	0	1	1.7	3
Tulpina				
<i>Marinococcus halophilus</i>	1,91	7,75	6,77	5,03
3-6	7,8	7,28	6,47	6,4

Activitatea 2.2. Selectarea enzimelor (lipaza și decarboxilaza)

Activitatea de selecționare a enzimelor lipaza și carboxilaza cu activitate catalitică pentru procesele chimice/ biochimice considerate a fost inițiată în cadrul etapei I/2014. Ea a fost continuată în această etapă. Aceasta a implicat testarea biomasei și a mediului de multiplicare celulară provenit de la partenerul CO. Testarea probelor biologice s-a realizat atât pentru reacția de sinteză a GliC din glicerol și dimetil carbonat (DMC), cât și pentru reacția de producere a GliD direct din GliC. Spermatantul culturilor a fost testat în ideea în care enzimele de interes pot fi exprimate în afara celulei. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul de mai jos. Sunt prezentate rezultatele obținute în cazul probelor care au prezentat un minim de reactivitate.

Se poate observa că în cazul sintezei GliC, uleiul de rapita, ca sursă de glicerol, permite producerea GliC cu o selectivitate maximă. Totuși, biomasa nu a dat rezultate pozitive în acest caz. O explicație o poate constitui faptul că substratul acestui proces, glicerolul, este și nutrient pentru celulă. Asta face ca celulă să se hrănească cu glicerolul prezent, fără a-l direcționa către procesul de interes. Acest aspect de selectivitate scăzută a biocatalizatorilor de tip celulă biologică este semnalat adesea în literatura de specialitate. O propunere pentru remedierea acestui aspect ar fi utilizarea unei cantități mai mari de glicerol.

În cazul procesului de sinteză a GliD, deși conversia generală este în intervalul de valori 70-98 % (conversii mari indicând eficiența bună în transformarea glicerolului), totuși selectivitatea în GliD este destul de mică (tendința generală a probelor studiate). Cea mai bună selectivitate a fost înregistrată în cazul glicerolului provenit de la uleiul de rapita (100 %). Totodată, uleiul de floarea soarelui a permis și el generarea GliD cu o selectivitate de 55.78 %. Un alt aspect înregistrat în cazul sintezei GliD din GliC este rezultatul pozitiv pentru biomasa. Acest fapt vine să susțină presupunerea anterioară cum că glicerolul este consumat de celule fără a fi utilizat în procesul dorit. În cazul de față substratul este GliC, deoarece acesta nu este recunoscut drept nutrient pentru celula biologică, a fost utilizat preponderent în procesul dorit. Selectivitatea obținută pentru cazul celulei drept biocatalizator este de maximum 16 %.

Tabel 1. Testarea biocatalizatorilor enzime în supernatant/ biomasa celulară.

Sursa biocatalizator	Conversie (%)	Selectivitate GliC (%)	Selectivitate GliD (%)
Sinteza GliC			
supernatant			
rapita	35.95	100.00	
P1	4.13	-	
Sinteza GliD			
supernatant			
rapita	70.44		100.00
floarea soarelui	94.17		55.78
palmier	98.29		-
S1	97.26		3.68
S3	97.25		2.23
R1	96.63		12.61
R3	98.08		-
biomasa			
Celule 12	98.83		-
Celule 3	92.36		6.24
Celule 1	95.75		15.58
Celule 7	90.67		15.99

Activitatea 2.3. Prepararea biocatalizatorului cooperativ-dual

În vederea obținerii GliD din Gli, prin intermediar GliC, s-au preparat diferiți biocatalizatori bifuncționali pe bază de enzime pure imobilizate în matrice de lichid ionic, care mai apoi au fost testați în reacție.

Biocatalizatorul bifuncțional este un concept uzual în biocataliză. Acest model de biocatalizator implică o structură heterogenă, în cazul de față aceasta fiind obținută prin încapsularea enzimei în matrice de lichid ionic. Activitatea cooperativ-duală a biocatalizatorului se concretizează în asistarea catalitică a două procese chimice diferite care pot fi dezvoltate succesiv (transesterificare glicerol cu DMC asistată de lipază și decarboxilarea GliC în prezența lichidului ionic care conduce la GliD).

Trebuie menționat că există evidențe experimentale care atestă posibilitatea celor două componente catalitice (lipaza și lichid ionic) de a-și exercita rolul de catalizator indicat, în mod singular, rămânând astfel să demonstrăm că cele două componente aduse împreună în aceeași structură catalitică pot funcționa în mod similar. De asemenea, sunt raportate în literatură diferite experimente care confirmă posibilitatea funcționării împreună a enzimei și a lichidului ionic.

Astfel, în urma acestor informații, am încercat obținerea unor biocatalizatori eficienți în procesul de sinteză al GliD. Într-o primă etapă, în tuburi Eppendorf de 1,5 ml s-au imobilizat patru tipuri diferite de enzime (lipaza din *Aspergillus niger*, lipaza din *Candida antarctica* imobilizată pe rasina acrilică, lipaza din *Pseudomonas capacea* imobilizată în sol-gel-AK și lipaza din *Candida antarctica* imobilizată în sol-gel-AK) cu patru tipuri diferite de lichide ionice ([EMIM][Cl] 1-etil-3-metilimidazol cloridă, [BMIM][PF₆] 1-butil-3-

metilimidazol hexafluorofosfat, [BMIM][BF₄] 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat si [BMIM][Cl] 1-butil-3-metilimidazol clorida, figura II.1).

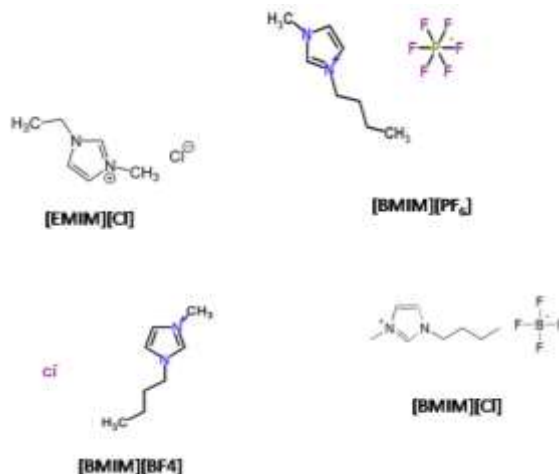


Figura II.1. Structurile lichidelor ionice utilizate în imobilizarea enzimelor.

Pentru imobilizare, au fost adăugate 50 mg enzimă într-o matrice de 50 mg lichid ionic, timp de 30 minute, sub agitare, la temperatura ambientală. Ulterior, biocatalizatorii obținuți au fost testați în reacție, în vederea obținerii de GliD. Peste catalizatorii biofuncționali proaspăt preparați, s-au adăugat glicerol și DMC într-un raport molar Gli:DMC = 1:10 (0,1g Gli, 1ml DMC) și mai apoi au fost incubați sub agitare, timp de 24h, la o temperatură de 60 °C. Datorită excesului de DMC, sistemul nu a mai avut nevoie de un alt solvent (sistem solvent-free).

După terminarea timpului de reacție, biocatalizatorii au fost separați din mediu prin centrifugare la 6000 rpm timp de 10 minute. Faza lichidă a fost ulterior evaporată la vid la 50 °C, pentru îndepărtarea DMC-ului aflat în exces și a metanolului format în reacție, astfel ca la final, să se găsească doar glicerolul nereacționat, produsul de interes și eventuali derivați. Producții uscați au fost derivatizați și mai apoi analizați prin GC-FID (cromatografie de gaze cu detector cu ionizare în flacără).

În urma rezultatelor bazate pe screeningul realizat anterior, următoarea încercare în prepararea catalizatorului bifuncțional s-a bazat pe o singură enzimă și anume Lipase acrylic resin din *Candida antarctica* și variația conținutului de lichid ionic. Asemenea primului caz, s-au imobilizat 50 mg enzimă într-o matrice de lichid ionic cu cantități de 100, 150 respectiv 200 mg lichid ionic ([EMIM][Cl], [BMIM][PF₆], [BMIM][BF₄] și [BMIM][Cl]), timp de 30 minute, sub agitare, la temperatura ambientală. După preparare, aceștia au fost testați în reacție, urmând aceiași pași menționați anterior: biocatalizator + 0,1g Gli + 1ml DMC, 24h, 60°C, urmat de centrifugare, derivatizare și analiza produsului de reacție.

O altă abordare în ceea ce privește prepararea biocatalizatorului bifuncțional, a însemnat imobilizarea enzimei cu particule magnetice în sistem ELMP (*enzyme linked magnetic particles*, enzimă imobilizată direct pe particule magnetice) și CLEMPA (*cross-linked enzyme aggregates into magnetic particles aggregates*, agregate enzimatice interconectate cu particule magnetice) și mai apoi introducerea acestora în matrice de lichid ionic.

Astfel, în tuburi Eppendorf de 1,5 ml s-au dizolvat 100 μl lipază *Aspergillus niger*/ 10 mg lipaza *Candida antarctica* în 250 μl soluție tampon MES (pH = 4), după care s-au adăugat 50 μl particule magnetice (fluidMAG-Amine și fluidMAG-PEA). În cazul biocatalizatorilor de tip CLEMPA, moleculele de enzimă dispersate în mediu au fost precipitate sub formă de agregate enzimatice prin adăugarea unui volum de 250 μl DMC. Ulterior, moleculele de enzimă au fost imobilizate prin adăugarea a 250 μl GA. În final, biocompozitele au fost separate prin aplicarea unui câmp magnetic, decantate și spălate cu soluție PBS 25 mM. În urma separării, peste biocompozit s-a adăugat 50 μl lichid ionic [BMIM][BF₄]. După 30 minute sub agitare la temperatura camerei biocatalizatorii bifuncționali astfel obținuți au fost testați în reacție: biocatalizator + 0,1 g Gli + 1 ml DMC, 24 h la 60 °C, urmat de centrifugare, derivatizare și analiza produsului.

O alta etapa în vederea obținerii GliD din glicerol, prin intermediar GliC, a presupus testarea de diferiți biocatalizatori bifuncționali pe bază de celule biologice capabile de a produce enzime lipaze și decarboxilaze, precum și mediile de cultura corespunzătoare.

Trei tipuri diferite de tulpini provenite din diferite surse au fost testate pentru a evalua capacitățile producătoare de enzime extracelulare (lipaza și decarboxilaza). Multiplicarea celulară s-a realizat de către partenerul CO. De asemenea, a fost studiat potențialul de creștere bacteriană pe diferite medii de cultură în prezența glicerolului rezidual. S-au realizat teste de evidențiere a activității lipazelor și decarboxilazelor exprimate în mediul de creștere celular (în cazul mediilor lichide).

Ulterior, biomasa produsă a fost testată pentru a evalua activitatea biocatalitică în procesele de transesterificare și decarboxilare necesare sintezei compușilor de interes (GliC și GliD). A fost analizată atât masa celulară, cât și supernatantul folosit drept mediu de cultură. Testarea supernatantului s-a făcut pe baza supoziției prin care biomasa celulară ar putea elimina o parte din proteinele generate. S-a urmărit punerea în evidență a prezenței celor doi produși de interes (GliC și GliD) în amestecul de reacție rezultat.

În acest scop, în tuburi Eppendorf, peste 100 μl biomasă (sau 200 μl în cazul supernatanților) s-au adăugat glicerol și dimetilcarbonat într-un raport molar Gli:DMC = 1:10 (0,1 g Gli la 1ml DMC) în vederea obținerii de GliD.

O altă abordare în vederea obținerii compușilor de interes, a fost utilizarea în reacția dintre Gli și DMC, a unor biocatalizatori pe bază de lipaza purificată și celule producătoare de lipază, dar și a unor biocatalizatori cooperativi pe bază de lipază și decarboxilază, în amestec. Totodată, biocatalizatorii considerați au fost testați și în prezența matricei lichidului ionic BMIMPF₆.

De asemenea, s-a experimentat și cea de-a doua etapă a sintezei GliD, plecând de la GliC. În acest caz biocatalizatori au fost decarboxilaza pură sau provenită de la celule producătoare de decarboxilază (biomasa și supernatantul). În acest caz s-au adăugat peste 100 μl GliC, 900 μl THF, ce servește drept solvent al mediului de reacție și 100 μl biomasă/ 200 μl supernatant biomasă. Condițiile experimentale și metoda de analiza a produsilor sunt similare cu cele utilizate anterior.

O alta etapa în vederea obținerii GliD din glicerol, a fost sinteza pornind de la glicerol. Astfel, au fost testați diferiți biocatalizatori bifuncționali pe bază de supernatanti proveniti de la culturi biologice și care au conținut de lipaze și decarboxilaze. Probele biologice au fost obținute de partenerul CO.

Doua tipuri diferite de linii celulare provenite din diferite surse (*M. halophilus*, LC1 și LC2) au fost incubate în medii de creștere diferite (R-AGAR 5 % NaCl, M1 și R-AGAR 10 % NaCl, M2). Din dorința de a afla dacă timpul de incubare are o influență semnificativă în cadrul procesului, supernatanții au fost prelevați după intervale de 16, 22, 40 și respectiv 96 ore. De asemenea, probele biologice au fost testate în prezența de matrice de lichid ionic [BMIM][BF₄]. S-a urmărit punerea în evidență a prezenței celor doi produși de interes (GliC și GliD) în amestecul de reacție rezultat.

În acest scop, în tuburi Eppendorf, peste 200 μl supernatant s-au adăugat 100 μl lichid ionic și glicerol, respectiv dimetilcarbonat, într-un raport molar Gli:DMC = 1:10 (0,1 g Gli la 1 ml DMC). Ulterior a fost incubat sub agitare, timp de 24 h, la o temperatură de 50 °C. După reacție, biocatalizatorii au fost separați din mediu prin centrifugare la 6000 rpm timp de 10 minute. Faza lichidă a fost ulterior evaporată la vid la 50 °C, pentru îndepărtarea DMC-ului aflat în exces și a metanolului format în reacție. Produșii uscați au fost ulterior derivați și mai apoi analizați prin GC-FID (cromatografie de gaze cu detector cu ionizare în flacără).

Totodată, s-a experimentat și cea de-a doua etapă a sintezei GliD, plecând de la GliC. În acest caz s-au adăugat peste 200 μl supernatant biomasă, 100 μl lichid ionic, 100 μl GliC și 900 μl THF, ce servește drept solvent al mediului de reacție. În continuare, au fost realizați aceiași pași menționați în primul caz: incubare timp de 24 h, la 50 °C, urmat de centrifugare, derivatizare și analiza produsului de reacție.

Pentru identificarea produsilor de reacție s-a efectuat analiza GC-FID (cromatografie de gaze cuplata cu detecție cu ionizare în flacără). Înainte de injectarea probelor în cromatograf, acestea au fost derivați (silanizare). În acest scop s-au adăugat 100 μl agent de silanizare (BSTFA) și 100 μl piridină peste amestecul de produși (rămas după evaporare). Amestecul obținut a fost lăsat sub agitare timp de 30 min la o temperatură de 50 °C. După derivatizare, 1 μl din fiecare probă a fost analizat cu ajutorul aparatului GC-FID (Schimadzu GC-2014, Thermo Electron Scientific Corporation, USA). Cromatograful a fost echipat cu coloana capilară DB5, nepolară, a cărei compoziție este 5% fenil-metilpolisiloxan. Detectorul și injectorul au fost setați la temperatura de 250 °C, iar temperatura din cuptor a fost menținută inițial constantă la 50 °C, timp de 1 min și apoi a fost crescută la 250 °C, cu o rampă de 10 °C/ min. Identificarea compușilor de interes s-a realizat utilizând standardele

corespunzatoare (glycerol, glycerol carbonat și glicidol), pe baza timpilor de retenție corespunzători. În figura II.2 este exemplificată o cromatogramă GC-FID în care apar cei trei analiți de interes.

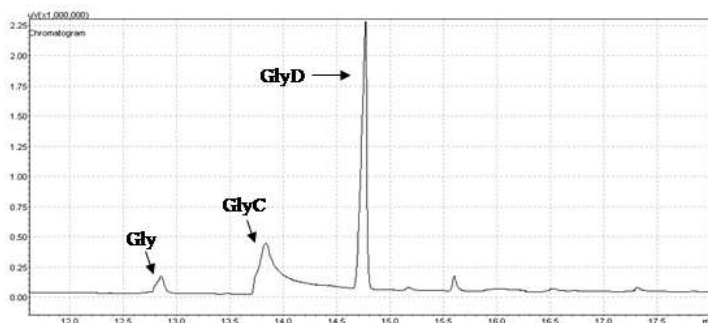


Figura II.2. Cromatogramă probei S40h *M. halophilus* LC1 5% NaCl în matrice de [BMIM][BF₄], în prezența Gli+DMC

În figura II.3 este prezentat comportamentul enzimelor de tip lipază imobilizate în matricea lichidului ionic [EMIM][Cl]. Se observă că există două surse de lipază care prezintă activitate catalitică și anume *Aspergillus niger* și *Candida antarctica*. Conversiile corespunzătoare ale Gli sunt de 58 % și respectiv 86 %. *Aspergillus niger* prezintă selectivitate preponderant pentru GliC, în timp ce *Candida antarctica* demonstrează o tendință mai pronunțată către sinteza GliD. Din punct de vedere al selectivității în GliD, cele mai mari valori s-au înregistrat prin utilizarea lichidului ionic cu Lipase sol-gel *Pseudomonas*, 34 % înșă cu o conversie a Gli de numai 33 %. În general, reacțiile desfășurate în condițiile indicate în figura II.3 au favorizat formarea GliC. Inclusiv în reacția oarbă aceasta tendință este prezentă. Astfel, se poate explica prezența dominantă a GliC. În structura biocatalizatorului, lichidul ionic este menit să catalizeze formarea GliD din GliC. În cazul de față, lichidul ionic favorizează producerea GliC și nu a GliD. Deci, structura biocatalizatorului testat nu prezintă o componentă catalitică pentru sinteza GliD.

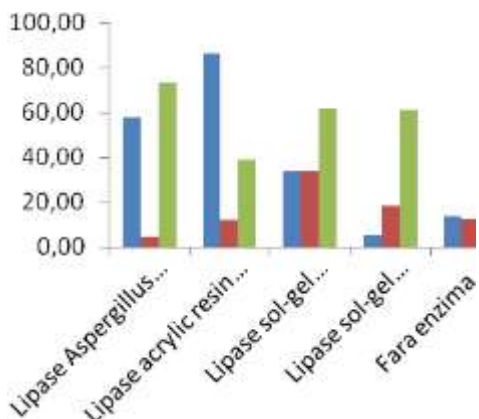


Figura II.3. Performanțele biocatalizatorilor ce conțin lichidul ionic [EMIM][Cl]. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■, selectivitate GliC (%) ■.

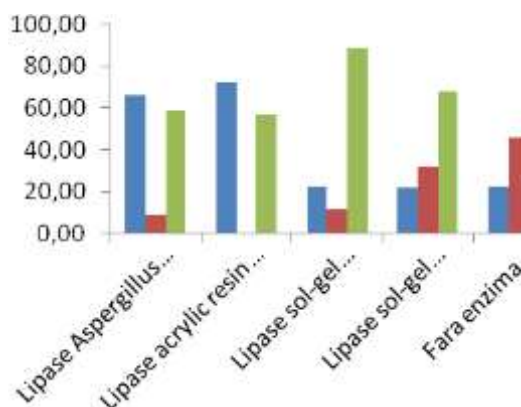


Figura II.4. Performanțele biocatalizatorilor ce conțin lichidul ionic [BMIM][PF₆]. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■, selectivitate GliC (%) ■.

Următorul lichid ionic testat a fost [BMIM][PF₆] (figura II.4). În acest caz se observa un comportament similar cazului anterior. Cele două enzime *Aspergillus niger* și *Candida antarctica* au permis conversia a 65 % și chiar 72 % Gli. Din păcate însă, selectivitatea în GliD este foarte mică. Cea mai mare valoare a selectivității în GliD este de 32 %, fiind obținută prin utilizarea în reacție doar a lichidului ionic, fără enzimă. Această observație demonstrează că lichidul ionic [BMIM][PF₆] este un bun catalizator în sinteza GliD. Totuși, activitatea acestuia pare estompata de prezența enzimei. Acest lucru s-ar putea realiza în cazul în care mecanismul de producere a

GliD nu ar trece prin etapa intermediară de GliC. Ceea ce înseamnă că prezența enzimei care vine să catalizeze procesul de sinteză a GliC, duce la o scădere a concentrației de Gli necesare, de altfel, procesului de obținere a GliD. Și astfel, materia primă necesară GliD devine insuficientă.

Un alt lichid ionic testat a fost [BMIM][BF₄]. Rezultatele experimentale sunt prezentate în figura II.5. Deși se observă o evoluție similară a conversiei odată cu variația sursei de enzimă, totuși valori absolute ale conversiei sunt mai mari. În acest caz valorile cele mai mari ale conversiei Gli și ale selectivității în GliD, s-au obținut prin utilizarea lichidului ionic împreună cu enzima Lipase acrylic resin *Candida antarctica*. S-au înregistrat astfel o conversie maximă de 70 % și o selectivitate de aproximativ 30 %.

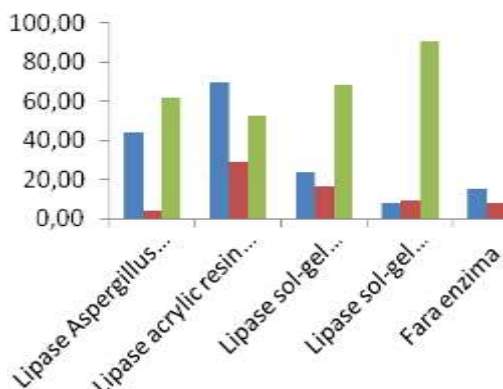


Figura II.5. Performanțele biocatalizatorilor ce contin lichidul ionic [BMIM][BF₄]. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■, selectivitate GliC (%) ■.

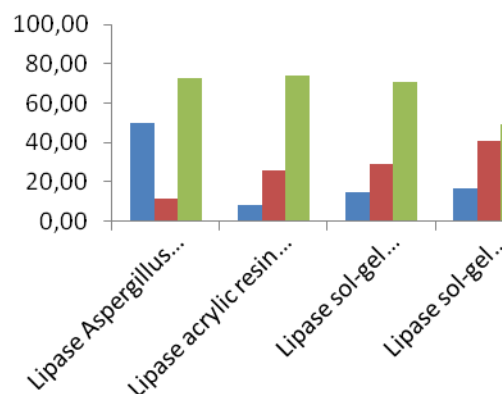


Figura II.6. Performanțele biocatalizatorilor ce contin lichidul ionic [BMIM][Cl]. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■, selectivitate GliC (%) ■.

Ultimul lichid ionic utilizat în screening a fost [BMIM][Cl] (figura II.6). În acest caz s-au obținut valori mari ale selectivității în GliD (ex. 40 % prin utilizarea lichidului ionic împreună cu Lipase sol-gel *Candida Antarctica*). Totuși, aceste rezultate trebuie privite în contextul conversiei materiei prime care este Gli. Din acest punct de vedere, experimentele suferă o depreciere, conversiile atingând valori foarte mici (maximum 20 % conversie Gli). Există o singură excepție, lipaza *Aspergillus niger* pentru care conversia a fost de 50 %. Asemănător cazurilor anterioare, GliC deține procentul cel mai mare în compoziția amestecului după reacție. Totuși, în lipsa enzimei, GliC scade în compoziție în favoarea GliD. Acest comportament demonstrează că lichidul ionic [BMIM][Cl] este util drept catalizator în sinteza GliD.

O imagine de ansamblu asupra rezultatelor obținute în experimentele de screening ne permite să observăm faptul că enzima lipaza acrylic resin *Candida Antarctica*, prezintă cele mai mari valori ale conversiei (maximum 86 %). De asemenea, trebuie menționat că în majoritatea cazurilor din acest screening, valorile selectivității în GliC sunt mari (pana la aproximativ 90 %), o concluzie în acest sens fiind că enzimele își îndeplinesc rolul și catalizează reacția de transesterificare a Gli cu DMC.

Pe baza acestor rezultate s-a ales ca enzima model pentru următoarele experimente lipase acrylic resin *Candida Antarctica*. Următorul pas în experimentele realizate a constat în varierea conținutului de lichid ionic din compoziția biocatalizatorului. A fost testat un raport enzima:lichid ionic (m/m) de 1:2, 1:3 și 1:4. De asemenea, datorită conversiilor extrem de mici obținute în experimentele de screening, lichidul ionic [BMIM][Cl] nu a mai fost luat în considerare. Parametrii calculați în aceste experimente au fost aceiași (conversia Gli, selectivitate în GliC și GliD). S-a urmărit cu preponderență îmbunătățirea selectivității în GliD.

Pentru lichidul ionic [EMIM][Cl] (figura II.7.), creșterea conținutului de lichid ionic în sistem a condus practic la o scădere accentuată a eficienței catalizatorului, atât conversiile cât și selectivitățile având de suferit. Această afirmație se bazează pe valorile obținute pentru selectivitatea în GliD. În schimb, conversia Gli prezintă valori mari (între 60 și 85 % conversie Gli), ceea ce se reflectă în conținutul de GliC și nu numai. Din punct de vedere al conversiei Gli, raportul 1:1 enzima:lichid ionic este optim.

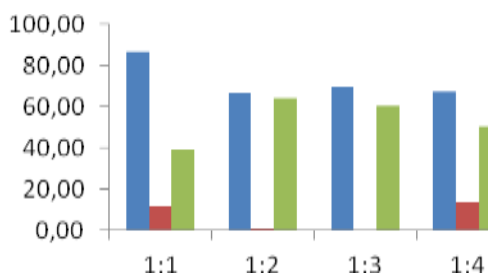


Figura II.7. Performanțele biocatalizatorilor prin variația conținutului de lichid ionic [EMIM][Cl]. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■, selectivitate GliC (%) ■.

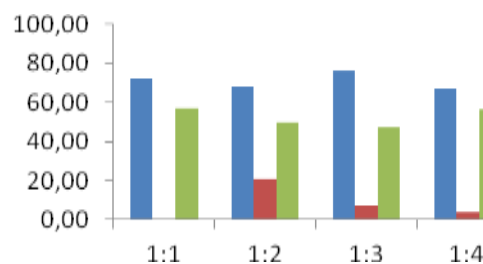


Figura II.8. Performanțele biocatalizatorilor prin variația conținutului de lichid ionic [BMIM][PF₆]. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■, selectivitate GliC (%) ■.

Figura II.8. prezintă un comportament asemănător celui descris anterior pentru biocatalizatorul testat în sistem. Totuși, în acest caz se poate discuta despre o îmbunătățire a selectivității în GliD atunci când raportul enzima:lichid ionic are valoarea de 1:2. Mai mult, se poate discuta chiar de o conversie substanțială a Gli în acest caz (72 %), ceea ce nu a mai fost întâlnit în experimentele anterioare.

Pentru lichidul ionic [BMIM][BF₄], datele experimentale sunt prezentate în figura II.9. Conversia procesului scade atunci când crește conținutul în lichid ionic al biocatalizatorului. Cazul 1:1=enzima:lichid ionic oferă o conversie de aprox. 70 % cu o selectivitate de 30 % în GliD. Acest caz este optimum posibil atins în experimentele realizate, de aceea se poate considera alternativa pentru următoarele studii experimentale.

Următorul pas în ceea ce privește prepararea biocatalizatorilor bifuncționali a reprezentat imobilizarea enzimei cu particule magnetice în sistem ELMP (enzima imobilizată direct pe particula magnetică)/ CLEMPA (agregate enzimatic și particule magnetice conectate prin agent de reticulare) și mai apoi introducerea lor în matricea de lichid ionic, cu scopul de a obține conformații mai stabile și mai active catalitic. Biocatalizatorii ELMP au fost obținuți în urma adăugării peste enzima dizolvată și particulele magnetice, a liantului, și anume glutaraldehida (GA). Astfel, grupările amino (-NH₂) și/sau grupările carboxil (-COOH) ale enzimei au fost imobilizate individual, prin legături covalente, de grupările funcționalizate ale particulelor magnetice. Trebuie menționat că nu doar o singură moleculă de enzimă se poate imobiliza de particulă, acestea putându-se lega și în număr de două sau trei molecule. Biocatalizatorii CLEMPA s-au obținut asemănător cu biocatalizatorii ELMP, cu deosebirea că, înainte de adăugarea glutaraldehidei, moleculele de enzimă dispersate în mediu au fost precipitate sub formă de agregate enzimatic, prin adăugare de DMC. S-a format astfel, o rețea în care moleculele de enzimă sunt legate atât între ele cât și cu particulele magnetice.

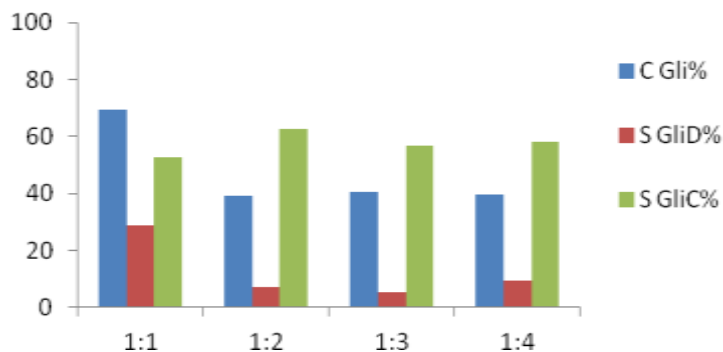


Figura II.9. Performanțele biocatalizatorilor prin variația conținutului de lichid ionic [BMIM][BF₄].

Au fost considerați aceiași parametri pentru a evalua capacitatea catalitică a biocatalizatorilor (conversia Gli, selectivitatea în GliC și GliD). Rezultatele obținute sunt prezentate în figura II.10. În ceea ce privește conversia glicerolului, valorile sunt foarte mici, până în 10 %. Totuși, în anumite cazuri apar selectivități în GliD bune, de până la 62 %. Este vorba despre reacțiile catalizate de biocatalizatorul CLEMPA

construiți cu fluidMAG-PEA și lipaza *Candida Antarctica*. Comportament similar l-a prezentat biocatalizatorul ELMP preparat cu fluidMAG-PEA și lipaza *Aspergillus niger*.

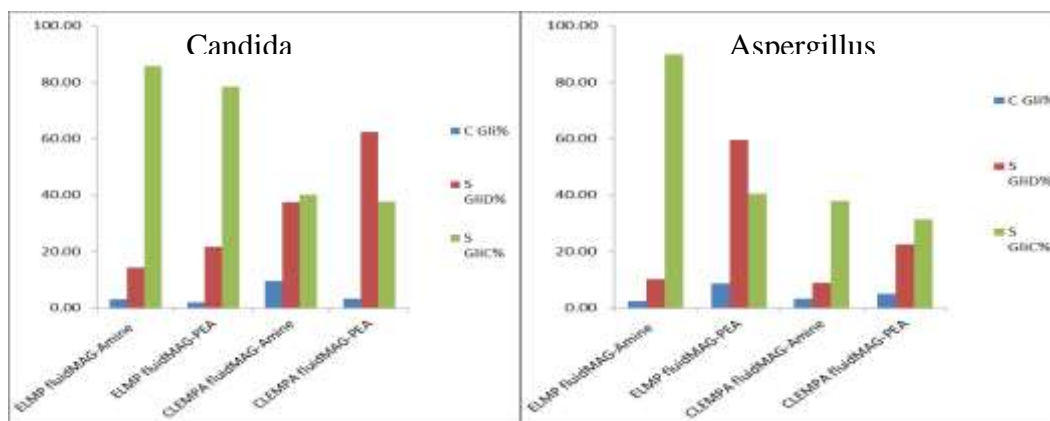


Figura II.10. Performanțele catalitice ale biocatalizatorilor ELMP și CLEMPA în matrice de lichid ionic [BMIM][BF₄].

Cea de-a doua etapa a studiului de față a debutat cu testarea biocatalizatorilor în forma simplă și mixtă. S-au experimentat fiecare din cele doua etape ale sintezei propusă. Pentru prima etapa s-a utilizat drept biocatalizatori lipaza pură (sursa *Candida antarctica*) și celula cu conținut de lipază, folosind atât biomasa cât și supernatantul. Experimente similare s-au realizat pentru etapa de decarboxilare a GliC la GliD. Au fost testați drept biocatalizatori piruvat decarboxilaza purificată, celula cu conținut de decarboxilază (masa biologică și supernatant). Pentru ambele etape a fost evaluată performanța sistemului și în matrice de lichid ionic.

Primele rezultate fac referire la utilizarea biocatalizatorilor de tip lipaza. În toate cele trei cazuri, conversia Gli este mică, până în 10 %. Așa cum era de așteptat, prin utilizarea lipazei pure selectivitatea în GliC este mare, de peste 60 %, în detrimentul GliD. Nu același lucru poate fi spus în cazul celulelor test folosite, unde deși conversia Gli este redusă, folosirea drept biocatalizator a supernatantului conduce la valori bune ale selectivității în GliD, de până la 67 %. Utilizarea biocatalizatorilor prezentați mai sus, în matrice de lichid ionic, conduc la schimbări importante. Astfel, conversiile Gli cresc de la sub 10% până la 50%. De asemenea, și selectivitatea în GliD pentru lipaza pură crește ușor, sugerând astfel că lichidul ionic acționează în favoarea formării de GliD. Cele mai importante schimbări se observă însă în cazul utilizării biomasei și supernatantilor în matricea lichidului ionic. În aceste cazuri, apar creșteri semnificative ale conversiei Gli și ale selectivității în GliD. Astfel, se formează o cantitate mai mare de produs de interes la finalul reacției.

Testarea decarboxilazei atât pură (sursa *S.cerevisae*) cât și provenită de la microorganismele test, a fost realizată plecând direct de la intermediarul GliC. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura II.11. În general, selectivitățile în GliD sunt aproximativ aceleași, în jur de 50 %, atât pentru enzima pură cât și pentru cea provenită din biomasa sau supernatant. Diferențe se observă în cazul conversiei GliC, enzima pură conducând la valori de până la peste 90 %, iar probele biologice sunt caracterizate de valori mult mai mici (27 % pentru biomasa și 47 % pentru supernatantul acesteia). Explicația constă în faptul că enzima purificată are o activitate catalitică mult mai bună decât cea existentă în celula biologică. Nu este vorba despre activitatea catalitică absolută, deoarece în cazurile indicate există procese complexe care includ cataliza enzimatică de interes. Un exemplu îl constituie migrarea prin membrana celulară a substratului, care determină o cinetică aparent lentă a enzimei. Este de subliniat faptul că piruvat decarboxilaza s-a comportat neașteptat de bine, în ciuda mediului ostil de reacție (THF).

În baza testelor realizate până în acest punct s-a putut demonstra că enzimele propuse pentru a constitui practic componente ale biocatalizatorului bifuncțional au activitate catalitică pentru reacțiile luate în discuție (lipaza pentru transesterificarea glicerolului cu DMC în vederea obținerii GliC și piruvat decarboxilaza pentru transformarea GliC în GliD).

În continuare, s-a dorit constituirea biocatalizatorului dual și a sistemului corespunzător. Cele doua enzime (lipaza și decarboxilaza) au fost adăugate împreună în sistemul de reacție. S-au testat atât enzimele pure și probele biologice, similar cu cazurile anterioare (biomasa și supernatant). Testele au inclus și evaluarea sistemului în prezența lichidului ionic [BMIM][PF₆]. Rezultatele sunt prezentate în Figura II.12.

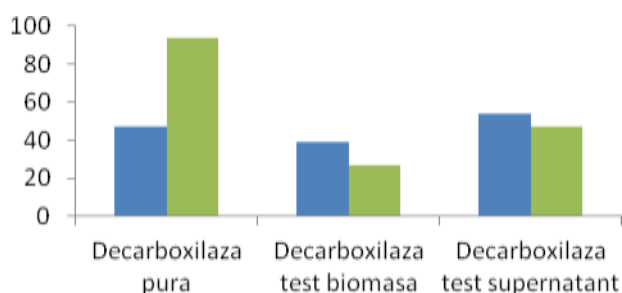


Figura II.11. Performanțele biocatalizatorilor de tip decarboxilaza. Conversie (%) ■, selectivitate (%) ■.

Enzimele purificate permit o conversie de 30 % glicerol, care scade dramatic la 10 % în prezența lichidului ionic. Similar cazurilor anterioare, selectivitățile în GliC și GliD suferă îmbunătățiri, ceva mai pronunțate în cazul GliD (de la aproximativ 40 % până la aproape 70 %). Pentru supernatanții probelor biologice, conversia Gli crește semnificativ prin folosirea lichidului ionic, până la aproximativ 50 %. În aceleași condiții, selectivitatea în GliC scade foarte mult, însă crește semnificativ selectivitatea în GliD (peste 90 %). Astfel putem trage concluzia că biocatalizatorul cooperativ-dual funcționează cel mai bine în aceste condiții, realizând succesiunea de reacții (formarea de GliC ca intermediar și mai apoi GliD). Se formează produsul de interes GliD în cantități semnificative.

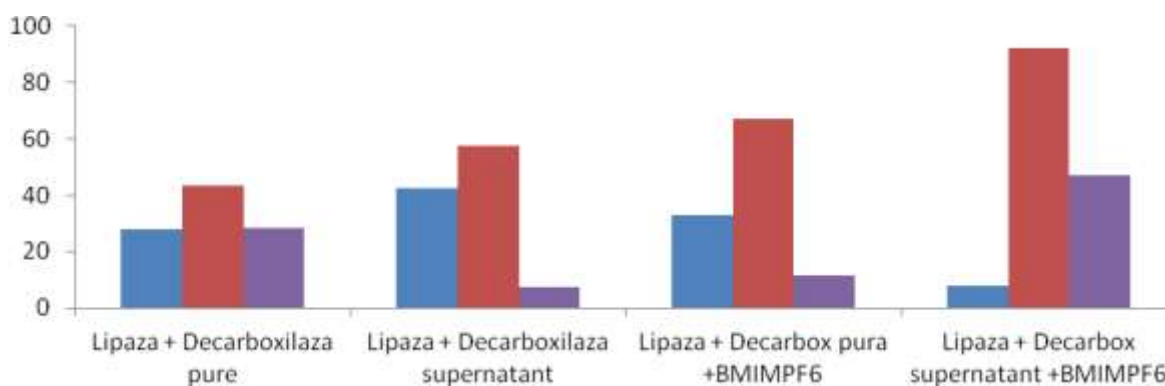


Figura II.12. Performanțele biocatalizatorilor de tip lipaza + decarboxilaza ca și aceștia în matrice de lichid ionic. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■ și selectivitate GliC (%) ■.

În continuare au fost testate linii celulare diferite cu conținut de lipază și decarboxilază (biomasa și supernatantul). Liniile celulare au fost denumite: LC1, LC2 și LC3. Supernatantul corespunzător a fost notat: S1LC1, S2LC2, S1LC2, S2LC2, S1LC3, S2LC3. De asemenea, fiecare dintre acestea au fost testate în matricea lichidului ionic [BMIM][PF₆]. În figura II.13 sunt prezentate rezultatele obținute pentru folosirea drept biocatalizator a celor trei tipuri de linii celulare.

În acest grup de experimente se observă că probele de biomasă (Glicerol celule LC1, *M.halophilus* R-AGAR 5 % NaCl, LC2 și *M.halophilus* 10 % NaCl, LC3), în general, au prezentat activitate biocatalitică redusă, conversiile Gli fiind mici, până la 5%. Acest lucru poate fi explicat pe baza mecanismului biochimic complex implicat în procesul de sinteză care presupune etape de penetrare a membranei celulare de către reactanți (glicerol și DMC), dar și eliminarea produsilor de reacție. Toți acești pași adiționali sintezei propriu-zise determină scăderea randamentului final. Biomasa celulară cu origini în mediul biodiesel (Glicerol celule) a prezentat însă activitate în sinteza GliD, obținând astfel o selectivitate în GliD de aproximativ 43 %. Totodată, toate cele trei tulpini testate au prezentat activitate catalitică în sinteza GliC. Totuși, conversiile mici ale glicerolului impun concentrații mici ale produsilor de reacție, în ciuda selectivităților avantajoase. În cazul

utilizării mediului de creștere celulară (supernatant) (Figura II.14), rezultatele sunt promițătoare. O observație generală se referă la valorile conversiei Gli (maximum 78 %). Aparent, Gli se transformă într-o mare proporție, față de cazul biomasei. Totuși, în amestecul de reacție nu au fost determinați produșii de interes. Acest fapt ne permite să afirmăm că în soluția de supernatant se află și alte tipuri de enzime exprimate celular care consumă glicerolul.

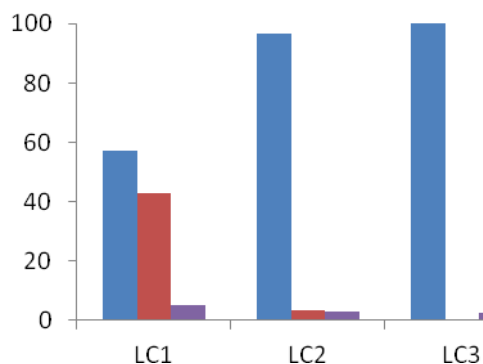


Figura II.13. Performanțele biomasei folosite drept biocatalizatori. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■ și selectivitate GliC (%) ■.

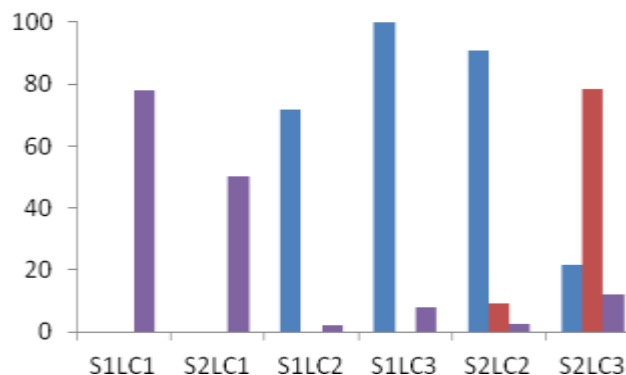


Figura II.14. Performanțele supernatantilor folosite drept biocatalizatori. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■ și selectivitate GliC (%) ■.

În cazul probelor S1LC2, S1LC3, S2LC2 și S2LC3, conversiile scăzute ale Gli (maximum 12 %) se pastrează, fiind însoțite de selectivități dominante pentru GliC. Totuși, în cazul folosirii unui supernatant al celulei *M.halophilus* 10 % NaCl (S2LC3), acesta conduce la valori foarte bune ale selectivității în GliD, de până la 78 %.

Testele prezentate anterior au fost realizate și în prezența unui lichid ionic [BMIM][PF₆] (Figura II.15 și Figura II.16). Figura II.15 prezintă comportamentul biocatalizatorului de tip celulă întreagă. Prezența lichidului ionic nu influențează semnificativ celulele LC1, însă determină schimbări importante în cazul celorlalte două. Astfel, conversia Gli crește de la 5 % până la aproximativ 35 %, iar selectivitatea în GliC scade în favoarea creșterii selectivității în GliD, acestea din urmă atingând valori de până la 45 %. Deoarece s-au folosit celule întregi, îmbunătățirea conversiei glicerolului poate fi explicată parțial pe baza procesului de hrănire a celulei cu glicerol. Deci, glicerolul care dispare din mediul de reacție nu este utilizat numai pentru procesul de interes.

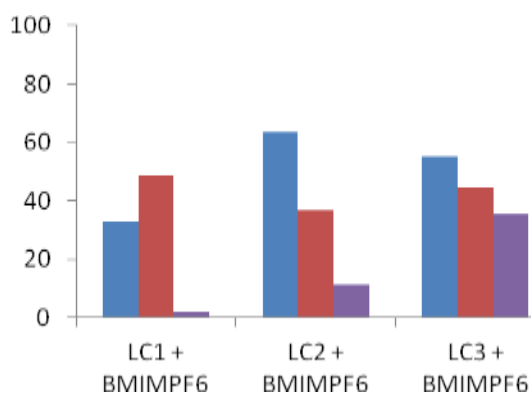


Figura II.15. Performanțele biomasei folosite drept biocatalizatori în matrice de [BMIM][PF₆]. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■ și selectivitate GliC (%) ■.

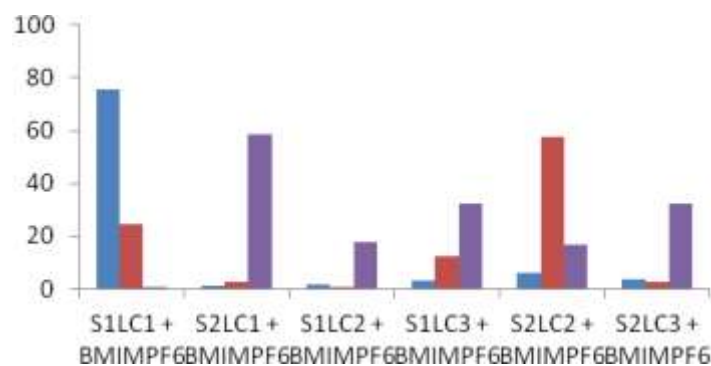


Figura II.16. Performanțele supernatantilor folosite drept biocatalizatori în matrice de [BMIM][PF₆]. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■ și selectivitate GliC (%) ■.

De aceea, conversia glicerolului nu constituie o valoare de referință atunci când vrem să evaluăm eficiența procesului de sinteză a GliD via GliC. Cu toate acestea, există o îmbunătățire a procesului de sinteză

datorată lichidului ionic, acest fapt fiind susținut de valorile îmbunătățite ale selectivității pentru GliD. Efectul lichidului ionic a fost testat și în cazul probelor de supernatant. Figura II.16 prezintă rezultatele obținute. În acest caz efectul major observat a fost creșterea conversiei Gli, de la 12 % la 32 %, precum și scăderea drastică a selectivității în GliC în favoarea creșterii selectivității în GliD (pana la 58 %). Se observă cum comportamentul biomasei din figura II.16 se regăsește și în cazul supernatantului. Acest fapt este de așteptat, mai ales atunci când îmbunătățirea valorilor de tip conversie este efectul direct al performanțelor sistemului biocatalitic de interes. Similar cu observațiile anterioare referitoare la probe de supernatant, și aici putem discuta doar de o conversie aparentă a glicerolului. Totuși, este de subliniat faptul că prezența lichidului ionic [BMIM][PF₆] îmbunătățește performanțele de sinteză ale sistemului către producerea GliD. O imagine de ansamblu asupra rezultatelor obținute în experimentele derulate în această etapă ne permite să observăm că în general, conversiile aparente ale Gli cresc prin folosirea supernatanților drept biocatalizatori, dar și prin utilizarea matricei de lichid ionic. De asemenea, selectivitatea în GliC scade în favoarea selectivității în GliD atunci când lichidul ionic este prezent în sistem. Deci, lichidul ionic favorizează formarea de GliD ca produs de reacție. Această observație vine să confirme date de literatură conform cărora lichidele ionice pot constitui catalizatori pentru producerea GliD. Pe baza rezultatelor promitatoare obținute în etapa anterioară prin utilizarea drept biocatalizatori a supernatanților, ne-am focusat pe utilizarea acestora în vederea obținerii produsilor doriți. Astfel, probele biologice obținute de partenerul CO au fost prelucrate și testate în mediul de reacție, individual, în funcție de linia celulară (LC1 și LC2), mediul de creștere (M1 și M2) și respectiv timpul de incubare (16 h, 22 h, 40 h și 96 h). De asemenea, acestea au fost testate și în fiecare din cele două etape de reacție ale procesului, de fiecare dată în prezența lichidului ionic [BMIM][BF₄], întrucât rezultatele anterioare ne-au dovedit că utilizarea de lichid ionic favorizează producerea de GliD. Rezultatele obținute sunt grupate în funcție de tipul de supernatant utilizat, factorul variabil fiind timpul de incubare.

Primele rezultate fac referire la supernatanții obținuți în urma incubării a unor probe biologice de *M.halophilus* LC1 R-AGAR 5 % NaCl (figura II.17). În acest grup de experimente se observă foarte ușor conversii extreme de bune în cazul glicerolului, acesta fiind consumat în timpul reacției aproape în totalitate, valorile ajungând până la aproximativ 99 %. Și în acest caz, asemănător celor din etapa anterioară, conversia glicerolului nu reprezintă o valoare de referință, întrucât este posibil ca acesta să fie consumat și de către microorganismele prezente în mediul de reacție. Cu toate acestea activitatea catalitică a biocatalizatorilor este una ridicată, selectivitățile în glicerol carbonat și glicidol suferind o creștere semnificativă. Astfel, cea mai ridicată valoare a selectivității în glicerol carbonat, peste 60 %, se regăsește utilizând supernatantul prelevat după un timp de 22 h, în timp ce o selectivitate mai ridicată în glicidol se observă în cazul utilizării supernatantului obținut după un timp de 40 h. Acest lucru poate sugera că abordând un timp de incubare mai îndelungat, supernatantul obținut conține o cantitate mai ridicată de decarboxilaze, fapt care conduce la o creștere a cantității de glicidol format în timpul reacției.

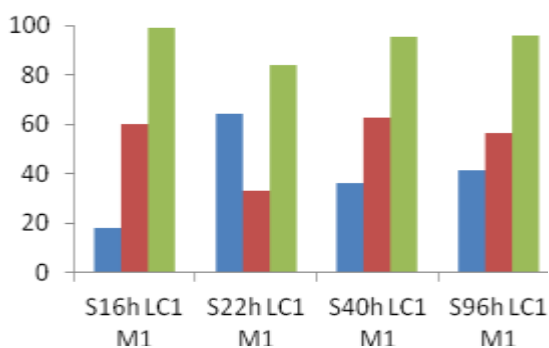


Figura II.17. Performanțele supernatanților LC1 din mediu R-AGAR 5 % NaCl, în matrice de [BMIM][BF₄], în prezența Gli+DMC. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■ și selectivitate GliC (%) ■.

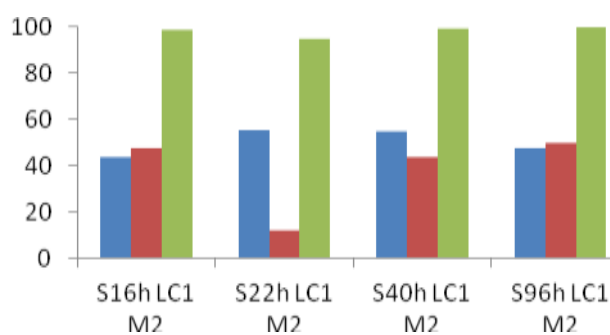


Figura II.18. Performanțele supernatanților LC1 din mediu R-AGAR 10 % NaCl, în matrice de [BMIM][BF₄], în prezența Gli+DMC. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■ și selectivitate GliC (%) ■.

Cel de-al doilea grup de rezultate obținute, spre deosebire de cel anterior, face referire la aceeași linie celulară, însă într-un mediu mai bogat în NaCl. În acest caz, utilizând supernatantul obținut din *M.halophilus* LC1 R-AGAR 10 % NaCl (figura II.18), se păstrează aceleași valori ridicate ale glicerolului, spre maximum

posibil. Diferente apar in ceea ce priveste selectivitatea in glicerol carbonat, acestea urmarind o usoara accentuare a valorilor in cazul unei incubari mai indelungate de timp de 40 h, respectiv 96 h. In ceea ce priveste inasa selectivitatea in glicidol, acestea se regasesc intr-o proportie usor scazuta fata de cazul anterior. Astfel, in urma analizarii tuturor supernatantilor obtinuti din prima linie celulara, putem spune ca un timp de incubare de 40 h si un mediu mai putin bogat in NaCl, de doar 5 %, conduc la rezultate mai bune in vederea obtinerii de glicidol, care reprezinta produsul final de interes.

Cea de-a doua linie celulara urmarita, *M.halophilus* LC2 R-AGAR 5% NaCl (figura II.19), pastreaza similar cu cealalta conversii extreme de bune ale glicerolului. Nu acelasi lucru se poate spune inasa despre selectivitatea in glicidol a supernatantilor utilizati, activitatea catalitica a acestora fiind mult mai redusa, singura exceptie putand fi observata pentru timpul de incubare maximum urmarit, de 96 h. O imagine diferita se poate observa in cazul selectivitatii in glicerol carbonat, acestea fiind mult mai ridicate, pana la aproximativ 85 % pentru supernatantul S40 h. Ceea ce dorim inasa sa obtinem este o selectivitate crescuta in glicidol, in acest caz, aceasta scazand in favoarea celei in glicerol carbonat. Acest lucru poate fi explicat pe baza ca mediul de crestere utilizat pentru aceasta linie celulara, nu este cel mai potrivit, conducand la cantitati mai reduse de decarboxilaze, fapt care conduce asa cum s-a si observat de altfel, la rezultate slabe in ceea ce priveste formarea de glicidol.

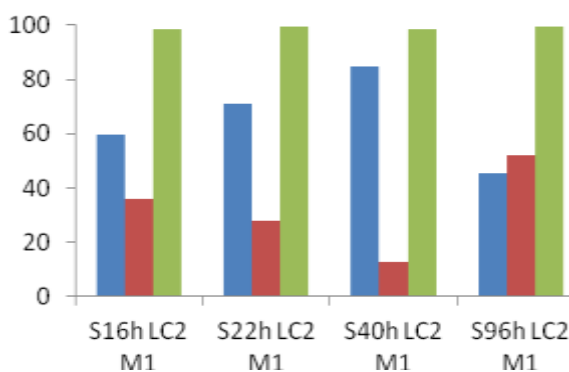


Figura II.19 Performanțele supernatantilor LC2 din mediu R-AGAR 5 % NaCl, in matrice de [BMIM][BF₄], in prezenta Gli+DMC. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■ si selectivitate GliC (%) ■.

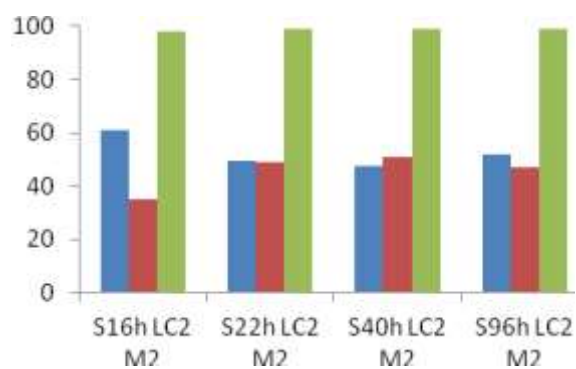


Figura II.20. Performanțele supernatantilor LC2 din mediu R-AGAR 10 % NaCl, in matrice de [BMIM][BF₄], in prezenta Gli+DMC. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■ si selectivitate GliC (%) ■.

Ultimul grup de rezultate pare sa confirme afirmatia de mai sus. Astfel, supernatantii obtinuti de la aceeasi linie celulara cu cea anterioara, inasa dintr-un mediu putin mai bogat in NaCl, de 10 % (figura II.20), conduce la un continut mai ridicat de decarboxilaze, activitatea catalitica a biocatalizatorilor urmarind aceeași tendinta in ceea ce priveste conversia glicerolului. Diferentele apar la selectivitatea in glicerol carbonat, acestea scazand chiar si sub 50 % in detrimentul cresterii selectivitatii in glicidol de pana la aproximativ 50 % in cazul S22h si S40h, fata de aproximativ 30% in cazul anterior.

Ca si concluzie, cele mai bune activitati au fost inregistrate utilizand un timp de incubare de 40 h, acestea fiind observate in cazul supernatantilor obtinuti din *M.halophilus* LC1 R-AGAR 5 % NaCl si LC2 R-AGAR 10 % NaCl, cu castig de cauza inasa pentru prima dintre cele doua. In acest caz a fost obtinut maximum in ceea ce priveste rezultatele, dintre toate incercarile realizate in cadrul proiectului, conversia glicerolului tinzand spre 100 %, iar selectivitatea in glicidol depasind valoarea de 60%. Trebuie mentionat inasa ca acest lucru a fost influentat si de prezenta lichidului ionic [BMIM][BF₄], dovezi in ceea ce priveste favorizarea formarii glicidolului fiind obtinute in cadrul experimentelor din etapele anterioare ale proiectului.

Experimente similare s-au realizat si pentru etapa de decarboxilare a GliC la GliD, rezultatele fiind grupate in aceeași maniera ca si pentru prima etapa, cu deosebirea ca in acest caz au fost urmarite conversia glicerol carbonatului si selectivitatea in glicidol. Astfel, pentru supernatantii proveniti de la primul tip de celule, cele mai bune rezultate au fost obtinute pentru un timp de incubare de 40 h, valorile atingand aproximativ 60 % in cazul conversiei, respectiv 80 % in cazul selectivitatii in glicidol.

Cel de-al doilea grup prezinta rezultatele obtinute in cazul utilizarii supernatantilor proveniti de la *M.halophilus* LC1 R-AGAR 10%NaCl (figura II.21). Spre deosebire de primul grup, mediul mai bogat in NaCl din cel de-al doilea conduce la rezultate mai slabe, atat in ceea ce priveste conversiile glicerol carbonatului, cat

si a selectivităților în glicidol. Cea mai bună activitate catalitică este obținută pentru un timp de incubare de 22 h, față de 40 h în primul caz, rezultatele atinând valori de aproximativ 50 % în cazul conversiei glicerol carbonatului și peste 90 % în ceea ce privește selectivitatea în glicidol. În urma analizării supernatantilor proveniți de la primul tip de celule putem spune astfel, că un conținut mai scăzut de NaCl în mediu, conduce la valori mai ridicate, iar maximum este obținut în urma recoltării supernatantului după 40 h.

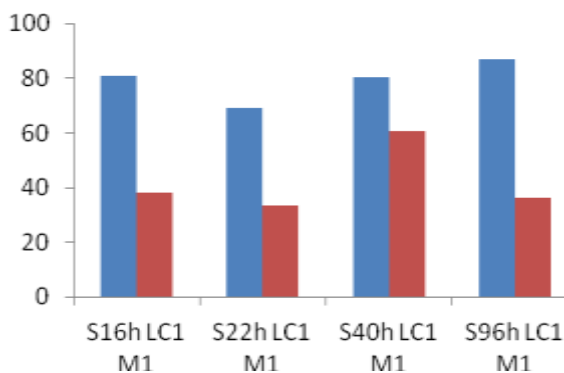


Figura II.21. Performanțele supernatantilor LC1 din mediu R-AGAR 5%NaCl, în matrice de [BMIM][BF₄], în prezența GliC. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■.

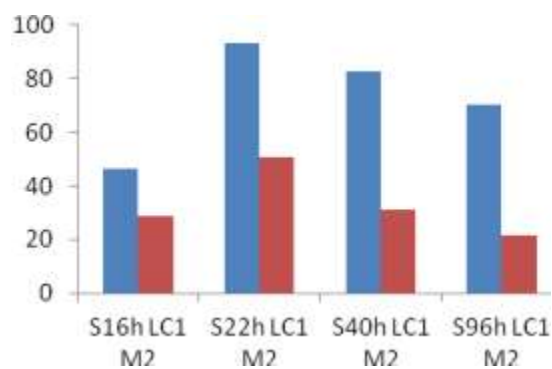


Figura II.22. Performanțele supernatantilor LC1 din mediu R-AGAR 10%NaCl, în matrice de [BMIM][BF₄], în prezența GliC. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■.

Cel de-al treilea grup prezintă rezultatele obținute în cazul utilizării supernatantilor proveniți din cea de-a doua linie celulară mediu cu 5 % NaCl și sunt ilustrate în figura II.22. Deși în cazul utilizării lor încă din prima etapă, rezultatele au fost mai slabe comparativ cu celelalte, prin utilizarea supernatantului obținut după 22 h în matrice de lichid ionic direct în cea de-a doua etapă a reacției, se obțin rezultate foarte bune. Astfel, pentru această probă, în urma interpretării rezultatelor, s-au obținut valori de până la 70 % conversie a glicerol carbonatului, respectiv 85 % selectivitate în glicidol. Acestea reprezintă de altfel și maximum obținut prin acest mod de abordare.

Ultimul grup din cadrul acestui proiect prezintă rezultatele obținute prin utilizarea mediului mai bogat în NaCl pentru incubarea celei de-a doua linii celulare (figura II.23). În acest caz, valorile conversiilor sunt mai mici față de grupul anterior, maximum fiind de aproximativ 45 %, pentru S22h, în timp ce valorile selectivităților se păstrează în continuare ridicate, până la aproximativ 90 %. Acest lucru, ținând cont și de rezultatele obținute prin primul mod de abordare al procesului, poate sugera că un mediu mai bogat în NaCl, conduce la eliberarea de decarboxilaze în supernatanti într-o cantitate mai redusă, fapt care conduce și la valori mai scăzute ale concentrației de produs de interes și anume glicidol.

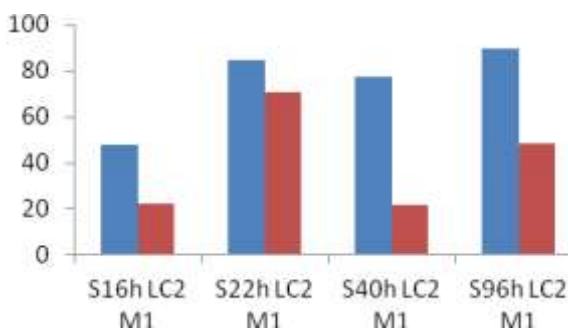


Figura II.23. Performanțele supernatantilor LC2 din mediu R-AGAR 5 % NaCl, în matrice de [BMIM][BF₄], în prezența GliC. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■.

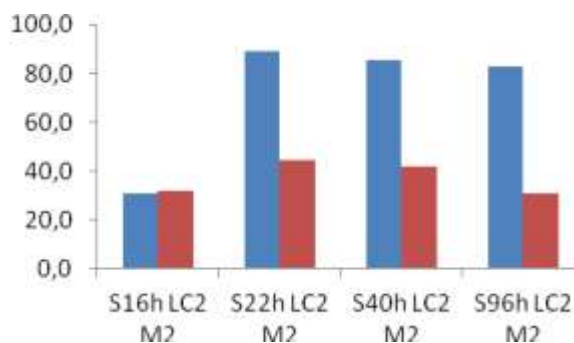


Figura II.24. Performanțele supernatantilor LC2 din mediu R-AGAR 10 % NaCl, în matrice de [BMIM][BF₄], în prezența GliC. Conversie (%) ■, selectivitate GliD (%) ■.

Ca și concluzie, prin introducerea biocatalizatorilor direct în cea de-a doua etapă a procesului urmărit,

cele mai bune rezultate au fost obtinute in urma utilizarii supernatantilor obtinuti dupa 22 h. Acest lucru poate fi pus si pe seama ca un timp mai indelungat de timp, poate conduce la eliberarea de alte substante care pot interveni in cadrul procesului. Astfel, perioada optima pentru acest caz este cea de 22 h, cele mai bune rezultate fiind obtinute utilizand supernatantul provenit de la *M.halophilus* LC2 R-AGAR 5 % NaCl, cu o conversie a glicerol carbonatului de aproximativ 70 % si o selectivitate in glicidol de aproximativ 85 %.

Activitatea 2.4. și 2.5.: Constructia sistemului biocatalitic in flux. Optimizarea sistemului biocatalitic in flux

Pe baza rezultatelor prezentate anterior s-a realizat sistemul biocatalitic pentru sinteza GliC si GliD. Astfel, discutia amanuntita din sectiunea anteriora este bine venita in contextul dezvoltarii unui sistem de sinteza. Sistemul biocatalitic are urmatoarele componente: pompa resistaltica, valva multipozitions, bireactor ce contine biocatalizatorul sub forma imobilizata in matrice de lichid ionic si adsorbit apoi in material poros si dispozitiv cu site moleculare pentru a retine metanolul generat in urma reactiei dintre dimetil carbonat si glicerol. Componentele sistemului au fost conectate prin intermediul tuburilor PEAK si conectorilor adecvati. Testarea si optimizarea sistemului implica set-area valorilor optime pentru viteza fluxului de reactanti prin sistem si implicit prin bioreactor si monitorizarea produsilor de reactie pentru a permite determinarea timpului optim de sinteza. In continuare se lucreaza la punerea la punct a sistemului in flux de obtinere a GliC si GliD. Testele preliminare realizate au permis obtinerea GliC cu o selectivitate de 70% si GliD cu o selectivitate de 55%.

Activitatea 2.6.: Testarea glicerolului residual in sistemul biocatalitic construit

A fost colectonat glicerol rezidual din procesul biodiesel realizat cu ulei alimentar si reziduuri de ulei menajer. In cazul uleiului alimentar au fost testate mai multe tipuri de uleiuri: ulei din floarea soarelui, masline, palmier, rapita, porumb, fasole. Glicerolul obtinut in fiecare dintre aceste cazuri a constituit substrat pentru reactia de sinteza a GliC. Rezultatele obtinute sunt prezentate sub forma de randament relative, raportat la valoarea randamentului pentru glicerolul standard in figura II.25.

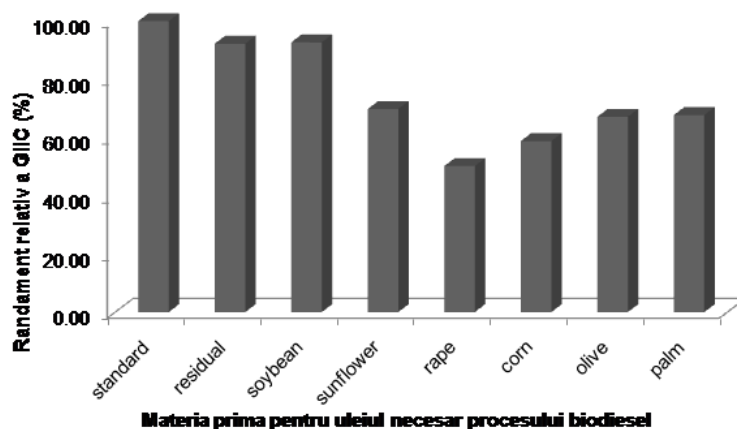


Figura II. 25. Utilizarea glicerolului din procesul biodiesel pentru sinteza GliC

In general, s-a mentinut o valoare a randamentului considerabil asemanatoare cu cea a glicerolului standard. Acest fapt indica un efect de matrice scazut care nu aduce prejudicii majore procesului de sinteza. Valorile maxime ale randamentului s-au inregistrat pentru uleiul rezidual si cel provenit de la fasole. Valori mici ale randamentului s-au inregistrat pentru uleiul provenit din rapita si porumb. In general, continutul de MeOH si apa din probele de glicerol sunt principalele cauze ale inhibiției procesului de transesterificare pentru DMC cu glicerol. In continuare se vor studia efectele MeOH si H₂O asupra sistemului biocatalitic existent. Totodata, se vor propune metode de pre-tratare a glicerolului acolo unde este cazul (efect de matrice dramatic). Toate aceste aspecte vor fi considerate in etapa urmatoare (etapa III/2016).

Activitatea 2.7 și 2.8. - Obținerea glicerolului rezidual (partea I și partea II)

Obținerea glicerolului ca și produs de utilizare comercială este realizată în puține tehnologii. De regulă glicerolul rezultă în diverse tehnologii ca și produs secundar. Atunci când timpul său nu era legat de obținerea biocombustibililor cantitatea de glicerol produsă era utilizată în diverse sectoare ale economiei, ca și industria cosmetică și farmaceutică, în industria materialelor de construcții și a materialelor de ambalaj și materiale de izolare. În conformitate cu orientarea generală europeană de reducere a consumurilor combustibililor fosili și înlocuirea cu combustibili din surse regenerabile, s-au stabilit sarcini de a produce biocombustibil, -biodiesel, - a început să apară excedent de glicerol, care trebuie să se găsească o utilizare economică viabilă. În industria biocombustibililor care porneste de la deseuri de produse oleaginoase la fiecare 10 t de biodiesel rezultă 1t de glicerol brut. De regulă în uleiurile vegetale grăsimile se află sub forma trigliceridelor unui acid alchilic, saturat sau nesaturat, mai rar sunt întâlnite triglicerite cu radicali alchilici diferiți. În Tabelul nr 1 este redată compoziția chimică a trigliceridelor în uleiurile vegetale.

În baza acestor date se poate calcula greutatea moleculară medie a trigliceridelor supuse proceselor de transesterificare. În urma acestei reacții rezultă esterii metilici ai acizilor alchilici saturati și nesaturati precum și glicerina. La fiecare 3 moli de esteri metilici ai acizilor alchilici cu un număr de atomi de carbon de la C₈-C₂₄ rezultă un mol de glicerina.

Tabelul nr.1. Compoziția chimică a trigliceridelor din produse oleaginoase

Nr. Ctr	Constituent chimic	Ulei de (%g)			
		Floarea soarelui	Rapita	Palmier	Soia
1	Acid caprilic	-	-	3,0	-
2	Acid caprilic	-	-	3,0	-
3	Acid lauric	-	-	52,0	-
4	Acid miristic	-	4,0	15,0	-
5	Acid palmitic	3,5	2,6	7,5	6,5
6	Acid palmitoleic 1Δ	0,2	0,6	2,5	-
7	Acid stearic	3,0	1,0	16,0	4,5
8	Acid oleic 1Δ	36,0	-	1,0	33,5
9	Acid oleostearic	-	-	-	-
10	Acid linolic 2Δ	56,3	-	-	52,5
11	Acid lindenic	-	1,5	-	-
12	Acid arachic	0,6	-	-	0,7
13	Acid behenic	-	2,1	-	-
14	Acid docosadienic 2Δ	-	0,9	-	-
15	Acid lignocerinic	-	0,5	-	-
16	Acid erucic	-	47,3	-	-
17	Acid linolenic 3Δ	-	-	-	2,3

În tabelul nr. 2 este redată greutatea moleculară medie a trigliceridelor continute în deseurile de uleiuri vegetale de diferite proveniențe și cantitatea de glicerina rezultată pentru fiecare kg de rezidii de ulei uzat procesat.

Tabelul nr. 2 - Greutatea moleculară medie a trigliceridelor continute în deseurile de uleiuri vegetale

Nr.ctr.	Trigliceride din ulei de:	GM /3	Cantitatea formată de glicerina în Kg glicerina/Kg ulei uzat
1	Floarea soarelui	293,688	0,1045
2	Rapita	322,28	0,0952
3	Palmier	284,76	0,1078
4	Soia	292,604	0,1049

Dupa cum rezulta de mai sus la fiecare kg de biodisel produs rezulta intre 9,5- 10,8% de glicerina ceea ce din punct de vedere economic devine ingrijorator privind cresterea stocurilor de glicerina bruta.

Tehnologia de laborator utilizata pentru obtinerea glicerolului brut

Lucrarile experimentale pentru obtinerea glicerinei sunt implicit identice cu cele de la obtinerea esterilor acizilor alchilici utilizati ca si biocombustibil prin transesterificarea grasimilor naturale, respectiv a uleiurilor vegetale . Astfel glicerina bruta se poate obtine din deseuri de uleiuri comestibile prin transformarea gliceridelor in esteri metilici sau etilici rezultand glicerina bruta. Aceasta reactie se poate efectua in faza lichida omogena folosind catalizatori acizi sau bazici. De regula se lucreaza in exces de alcool metilic sau etilic pentru deplasarea echilibrului spre dreapta.

Uleiul comestibil uzat provenit din colectarea de la restaurante, cantine, Mc'Donalds trebuie purificat de impuritatile solide din el printr-o filtrare si deshidratare prealabila, dupa care se prelucreaza dupa cum se descrie mai jos. Pentru aceasta se procedeaza astfel: intr-un reactor de sticla (Figura 1) echipat cu baie de termostatare, amestecator mecanic cu turatie reglabila , teaca termometrica si condensator de reflux total conectat la retea de apa de racire, se introduce un mol gram de deseuri de ulei de floarea soarelui (sau fractiuni) si 6 moli (sau fractiuni) de metanol in care s-au dizolvat catalizatorul de tip hidroxid, care in cazul nostru este hidroxidul de potasiu sau de sodiu.

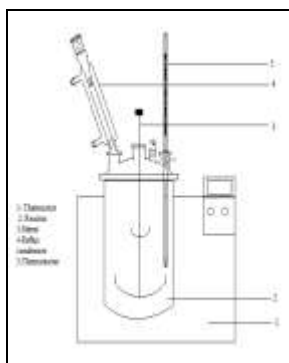


Figura 1. Schema instalatiei de laborator, utilizata la obtinerea glicerolului rezidual

Tehnologia de obtinere a biocombustibilului are loc la temperatura joasa de 60 -70°C in prezenta de catalizatori bazici de tip hidroxid si exces molar de metanol 1:2 fata de cantitatea de trigliceride. Concentratia catalizatorului este de 0,8378% fata de total amestec. Transesterificarea are loc in doua trepte de circa 1-1,5 ore la temperatura de 60-70°C. In prima treapta se introduce numai 75% din cantitatea de metanol necesara exesului de 1/1,5 cand din cei 6 moli de metanol se introduce 4,5 moli in care s-a dizolvat 52,8% din catalizatorul necesar intregii sarje. Dupa expirarea acestui timp se opreste agitarea si se lasa amestecul in repaus pentru cca . 30 minute . In reactor se formeaza doua faze: una superioara , constituita din esteri metilici si una inferioara care contine glicerina bruta scindata si urme de metanol in limita de solubilitate a acestuia in glicerina precum si sapun de potasiu format eventual cu acizii grasi liberi prezenti eventual in ulei . Se separa aceste faze cu ajutorul unei palnie de separare de volum corespunzator , iar faza superioara se reintroduce in reactorul de transesterificare din nou si se adauga diferenta de 1,5 moli de metanol in care s-a dizolvat cantitatea de 47,2% de catalizator pentru a ajunge la valoarea concentratiei finale de 0,88%.

Amestecul se omogenizeaza si se continua omogenizarea la temperatura de 70°C timp de inca 1-1,5 ore dupa care se opreste agitatorul si se transvazeaza amestecul intr-o palnie de separare, dupa care se lasa sa se limpezeasca amestecul. Dupa circa 30-40 minute de repaus, in palnia de separare sunt formate net, doua straturi. Stratul superior perfect transparent de culoare galbena sau galbuie, constituit din esteri metilici ai acizilor alchilici saturati si nesaturati , iar stratul inferior mai tulbure si inchis la culoare constituit din glicerina bruta si in care se afla in suspensie sarurile de potasiu ale acizilor organici liberi si urme de metanol, in limita solubilitatii acestuia in suspensia de sapunuri de potasiu din glicerina.

Cantitatea de suspensii provine din reactia acizilor organicii liberi care este functie de indicele de aciditate a uleiului folosit fie proaspat sau uzat. Indepartarea sapunurilor de potasiu din glicerina se face de regula prin filtrarea glicerinei brute si spalarea glicerinei cu solutie de acid citric de 5% in raport volumetric de 3 parti glicerina 1 parte acid citric.

In baza celor prezentate mai sus s-a facut o receptura de lucru pentru un reactor cu volmul util de 6 litri, care conduce dupa reactiile mai sus prezentate la urmatoare receptura totala de lucru:

- ulei de floarea soarelui uzat.....	3,634 Kg.....	3,480 L
- metanol.....	2,389 Kg.....	2,605 L
- hidroxid de potasiu.....	0,0504Kg.....	0,025 L
Toral sarja:	6,063Kg	6,110 L

In baza celor prezentate mai sus se poate face bilatul de materiale pentru fiecare operatie, sau faza asa cum se prezinta in tabelele de mai jos:

Tabelul nr.3 - Faza tratare initiala -Filtrare

Nr. Ctr	Materiale intrate			Nr. ctr	Materiale Iesite		
	Denumire component	Kg	%		Denumire component	Kg	%
1	Ulei uzat recuperat (floarea soarelui)	4,300	100,00	1	Ulei filtrat	3,750	87,21
				2	<u>Reziduu solid</u> -substante solide -ulei	<u>0,510</u> 0,485 0,015	11,86
				3	<u>Pierderi</u> -ulei	<u>0,040</u> 0,040	0,93
	Total intrat	4,300	100,00		Total iesit	4,300	100,00

Tabelul nr.4- Faza de deshidratare

Nr. Ctr	Materiale intrate			Nr. ctr	Materiale Iesite		
	Denumire component	Kg	%		Denumire component	Kg	%
1	Ulei filtrat	3,750	100,00	1	Ulei deshidratat	3,650	87,21
				2	<u>Ulei emulsionat</u> -substante solide -ulei	<u>0,090</u> 0,065 0,025	11,86
				3	<u>Pierderi</u> -ulei	<u>0,010</u> 0,040	0,93
	Total intrat	3,750	100,00		Total iesit	4,300	100,00

Tabelul nr 5 - Preparare solutie catalizator

Nr. Ctr	Materiale intrate			Nr. ctr	Materiale Iesite		
	Denumire component	Kg	%		Denumire component	Kg	%
1	<u>Metanol</u> -MeOH	<u>1,784</u> 1,784	98,531	1	Solutie de hidroxid in metanol -metanol -hidroxid	<u>1,8106</u> 1,784 0,0266	<u>100,00</u>
	2	Hidroxid de Potasiu -KOH					
	Total intrat	1,8106	100,00				

Tabelul nr.6- metanoliza I si separarea fazelor

Nr. Ctr	Materiale intrate			Nr. ctr	Materiale Iesite		
	Denumire component	Kg	%		Denumire component	Kg	%
1	<u>Ulei deshidratat</u> -ulei f.Soarelui	<u>3,650</u>	<u>66,843</u>	1	<u>Esteri metilici bruti</u> -esteri metilici -trigliceriden.r.	<u>4,7316</u>	<u>86,65</u>
		3,650					
2	<u>Solutie metanolica de hidroxid de potasiu</u> -metanol -KOH	<u>1,8106</u>	<u>33,157</u>				
		1,784		3	<u>Pierderi</u> -esteri metilici -metanol	<u>0,053</u> 0,040 0,013	<u>0,97</u>
		0,0266					
	Total intrat	5,4606	100,00		Total iesit	5,4606	100,00

Tabelul nr.7- metanoliza II si separarea fazelor

Nr. Ctr	Materiale intrate			Nr. ctr	Materiale Iesite		
	Denumire component	Kg	%		Denumire component	Kg	%
1 2	<u>Esteri metilici bruti</u> -ulei f.Soarelui n.r -esteri metilici	<u>4,7316</u>	<u>88,431</u>	1	<u>Esteri metilici bruti</u> -esteri metilici -metanol -KOH	<u>3,8356</u> 0,0504	<u>71,685</u>
	<u>Solutie metanolica de hidroxid de potasiu</u> -metanol -KOH	<u>0,619</u> 0,595 0,024	<u>11,569</u>	2	<u>Glicerina bruta</u> -glicerina bruta -sapun de KOH (oleati) -ulei nereactionat -metanol	<u>1,450</u> 1,087 0,034 0,182 0,147	<u>27,099</u>
				3	<u>Pierderi</u> -esteri metilici -metanol	<u>0,065</u> 0,030 0,035	<u>1,215</u>
	Total intrat	5,3506	100,00		Total iesit	5,3506	100,00

In baza reactiei si a echilibrului stoichiometric din aceasta reactie de metanoliza ar fi trebuit sa rezulte teoretic urmatoarele: esterii metilici - 3,700Kg; sa se consume 1,1945kg metanol; sa rezulte 1,144 Kg glicerina bruta; sa poata fi recuperat 1,1945Kg alcool.

In baza acestor date teoretice rezulta o conversie a uleiului de floarea soarelui recuperat de 95,02 % calculat in baza cantitatii de glicerina formata. In baza cantitatii de alcool recuperabil rezulta un randament teoretic probabil de 95% . Randamentul in esterii metilici ai acizilor grasi probail va fi de 3,700-(0,030+0,0400) = 3,63 x 0,95 adica cca. 93,2%.

In baza acestei tehnologii s-a obtinut si glicerol rezidual pornind de la ulei de palmier si ulei de rapita pe care partenerul CO l-a testat in investigatiile de microbiologie.

Diseminarea rezultatelor etapei 2: Biocatalizatori – sistemul biocatalitic

Rezultate asteptate:

- Biocatalizator cooperativ-dual
- Sistem biocatalitic in flux

Rezultate obtinute:

- Biocatalizator cooperativ-dual
- Sistem biocatalitic in flux
- Pagina de internet a proiectului actualizată
- 1 lucrare ISI în subiect comun cu al proiectului
- 1 lucrare ISI în subiect comun cu al proiectului, aflată în evaluare
- 1 lucrare în alte reviste, în subiect comun cu al proiectului
- Participarea la 7 conferințe științifice de specialitate

Lucrare ISI:

Manole A., Banciu C., 2015, Optimization of shoot multiplication in *Ruscus aculeatus* L. from long term cultures. Rom. Biotechnol. Letters, 20: 10200-10204

Lucrare ISI în evaluare:

Tudorache M., Negoii A., Parvulescu V.I., 2015, Biocatalytic conversion of renewable glycerol into value-added products like glycerol carbonate and glycidol, Catalysis Today

Lucrare în alte reviste:

Simona Neagu, Roxana Cojoc, Madalin Enache*, Ioana Gomoiiu, George Ghemes, Andreea Gheorghe, Madalina Tudorache, 2015, The growth of halophilic microorganisms in the presence of waste glycerol and its conversion in glycidol and glycerol carbonate, Marisia – Studii și Materiale, Stiințele naturii, XXXV

Prezentări orale conferințe:

Mădălin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Ioana Gomoiiu, George Ghemes, Andreea Gheorghe, Madalina Sandulescu, 2015, *Microorganismele halofile implicate in conversia glicerolului rezidual la produse utile*, conferinta internațională *Preocupări recente în cercetarea, conservarea și valorificarea patrimoniului cultural*, ediția a X-a, Muzeul Județean Mureș, 24-26 iunie 2015, Târgu-Mureș, Romania

Ancuța Trifoi, 2015, *Valorificarea glicerinei rezultate din industria biodieselului*, conferința “60 de ani de cercetare chimică la Mediaș, SC ICPAO SA Mediaș, 14 mai 2015

Mădălin Enache, 2015, *Proiectul BioGlyCat - cooperarea IBB - ICPAO SA Mediaș*, conferința “60 de ani de cercetare chimică la Mediaș, SC ICPAO SA Mediaș, 14 mai 2015

Postere conferințe:

Simona Neagu, Andreea Gheorghe, Mădălina Săndulescu, Mădălin Enache, 2015, *The potential of halophilic microorganisms to convert waste glycerol to valuable compounds: glycerol carbonate (GlyC) and glycidol (GlyD)*, 6th European Congress of Microbiologists, FEMS 2015 – Maastricht, Olanda, 7 – 11 iunie 2015

Madalina Tudorache*, George Ghemes, Andreea Gheorghe, Simona Neagu, Madalin Enache and Vasile Parvulescu, 2015, *Chemoenzymatic conversion of renewable glycerol to value-added products*, 12th Biotrans, Viena, Austria, 26 – 30 iulie 2015

M. Tudorache, G. Ghemes, A. Gheorghe, S. Coman, V.I. Parvulescu, 2015, *Biocatalysis in glycerol-based biorefinery for fine chemicals- Conversion of renewable glycerol into value-added products*, 12th European Congress on Catalysis - EuropaCat-XII, Kazan, Russian, 30 august - 4 septembrie 2015

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Ioana Gomoiu, 2015, *Halophilic microorganisms – ability to growth on old paint church and to convert waste glycerol*, 9th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica 2015, Thessaloniki, Grecia, 22-24 octombrie 2015

Mădălin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, Ioana Gomoiu, Andreea Gheorghe, George Ghemes, Mădălina Săndulescu, 2015, *The enzymes of extremophilic halophiles involved in conversion of waste glycerol to valuable compounds: glycerol carbonate (GlyC) and glycidol (GlyD)*, BioMicroWorld2015 - VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Barcelona, Spania, 28 – 30 octombrie 2015