



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Inginerie



**CERCETĂRI BIOTEHNOLOGICE DE
OBTINERE A BIOETANOLULUI DIN DEȘEURI
LIGNOCELULOZICE AGROINDUSTRIALE**

(REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT)

**Doctorand,
Ing. Cristian-Teodor BURUIANĂ**

**Conducător științific,
Prof.univ.dr.ing. Camelia VIZIREANU**

Seria I 1: Biotehnologii Nr. 2

GALAȚI

2013

26344/23.10.2013

Către

Universitatea “Dunărea de Jos “ din Galați vă face cunoscut că, în data de **23.11.2013 ora 10.30, în sala F 103 a Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor**, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: **„CERCETĂRI BIOTEHNOLOGICE DE OBTINERE A BIOETANOLULUI DIN DEȘEURI LIGNOCELULOZICE AGROINDUSTRIALE”**, elaborată de doamna/domnul **BURUIANĂ CRISTIAN-TEODOR**, în vederea conferirii titlului științific de doctor în domeniul de doctorat **Biotehnologii**.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1. Președinte | Prof.univ.dr.ing. Victor CRISTEA
Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați |
| 2. Conducător de doctorat | Prof.univ.dr.ing. Camelia VIZIREANU
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați |
| 3. Referent oficial | Prof.univ.dr.ing. Francisc PETER
Universitatea „Politehnica” din Timișoara |
| 4. Referent oficial | Prof.univ.dr.ing. Ioan MĂMĂLIGĂ
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași |
| 5. Referent oficial | Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE
Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați |

Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat, și vă invităm să participați la susținerea publică. În cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le transmiteți în scris pe adresa universității, str. Domnească nr. 47, 800008 Galați, Fax 0236 / 461353, e-mail rectorat@ugal.ro.



Prof. univ. dr. ing. Gabriel BÎRSAN

mat



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



Teza de doctorat a fost elaborată cu sprijinul financiar acordat de către proiectul **POSDRU/107/1.5/S/76822 – Calitatea și continuitatea formării în cadrul ciclului de studii doctorale – TOP ACADEMIC, Id 76822, acronim TOP ACADEMIC**, proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007–2013, axa prioritară 1: ”Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”, domeniul major de intervenție 1.5: ”Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării”, perioada de implementare: 1 octombrie 2010 – 30 septembrie 2013, Universitatea ”Dunărea de Jos” din Galați.

CUPRINS

CUVÂNT ÎNAINTE	23
I. STUDIUL DOCUMENTAR	
1. Structura și compoziția chimică a materialelor lignocelulozice	30
2. Procesul biochimic de conversie a materialelor lignocelulozice în bioetanol	32
3. Pretratarea materialelor lignocelulozice	34
3.1. Pretratamente fizico-chimice.....	35
3.1.1. Pretratament prin injecție de abur sub presiune.....	35
3.1.2. Pretratament în sistem de apă caldă.....	36
3.1.3. Pretratament prin explozie de CO ₂	36
3.1.4. Pretratament prin injecție de amoniac lichid.....	37
3.2. Pretratamente chimice.....	37
3.2.1. Pretratament cu acid.....	37
3.2.2. Pretratament alcalin.....	38
3.2.3. Pretratament prin oxidare umedă.....	38
3.2.4. Pretratament cu ozon.....	38
3.2.5. Pretratament prin metoda organosolv.....	38
4. Hidroliza enzimatică a materialelor lignocelulozice	40
4.1. Celulazele și microorganismele producătoare de celulaze.....	40
4.2. Hemicelulazele și microorganismele producătoare de hemicelulaze.....	40
5. Fermentarea materialelor lignocelulozice	42
6. Integrarea proceselor tehnologice	43
6.1. Hidroliza și fermentarea separată (SHF).....	43
6.2. Zaharificarea și fermentarea simultană (SSF).....	44
6.3. Zaharificarea și co-fermentarea simultană (SSCF).....	46
Referințe bibliografice.....	49

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ

7. Obținerea bioetanolului de a doua generație prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim discontinuu și semicontinuu a biomasei lignocelulozice de porumb pretratată hidrotermic.....	59
7.1. Introducere.....	60
7.2. Materiale și metode.....	63
7.2.1. Măcinarea biomasei lignocelulozice de porumb.....	63
7.2.2. Determinarea compoziției chimice a biomasei lignocelulozice de porumb.....	64
7.2.2.1. Determinarea conținutului de umiditate.....	64
7.2.2.2. Determinarea conținutului de cenușă.....	65
7.2.2.3. Determinarea conținutului de poliglucide prin hidroliza acidă cantitativă (QAH).....	66
7.2.2.4. Determinarea conținutului de lignină Klason.....	68
7.2.2.5. Determinarea conținutului de substanțe extractibile prin extracția Soxhlet.....	69
7.2.2.6. Determinarea compoziției chimice a biomasei lignocelulozice de porumb supuse extracției Soxhlet.....	70
7.2.2.7. Identificarea și cuantificarea compușilor esențiali prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC).....	70
7.2.3. Pretratamentul biomasei lignocelulozice de porumb.....	74
7.2.3.1. Pretratamentul hidrotermic prin autohidroliza în condiții non-izoterme.....	74
7.2.3.2. Determinarea severității pretratamentului.....	74
7.2.4. Determinarea compoziției chimice a biomasei lignocelulozice de porumb rezultată în urma pretratamentului.....	75
7.2.4.1. Determinarea conținutului de compuși non-volatili.....	76
7.2.4.2. Determinarea conținutului de oligomeri prin posthidroliză.....	76
7.2.5. Hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma pretratamentului	78
7.2.6. Zaharificarea și fermentarea simultană (SSF) a fazei solide rezultată în urma pretratamentului.....	79
7.2.6.1. Reactivarea culturii liofilizate de drojdie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CECT-1170 (tulpina DCL 740).....	79

7.2.6.2. Cultivarea drojdiei și prepararea inoculului.....	80
7.2.6.3. Procesul de zaharificare și fermentare simultană în regim discontinuu.....	81
7.2.6.4. Procesul de zaharificare și fermentare simultană în regim semicontinuu.....	82
7.2.7. Determinarea compoziției chimice a fazei solide rezultată în urma proceselor SSF.....	82
7.2.8. Analiza statistică a datelor experimentale.....	83
7.3. Rezultate și discuții.....	83
7.3.1. Analiza compoziției chimice a biomasei lignocelulozice de porumb...	83
7.3.2. Studiul pretratamentului biomasei lignocelulozice de porumb.....	84
7.3.2.1. Fraționarea biomasei lignocelulozice de porumb.....	86
7.3.2.2. Susceptibilitatea fazei solide la hidroliza enzimatică.....	88
7.3.3. Studiul și optimizarea zaharificării și fermentării simultane în regim discontinuu a fazei solide rezultată în urma pretratamentului.....	92
7.3.4. Obținerea bioetanolului prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma pretratamentului...	101
7.4. Concluzii parțiale.....	106
Referințe bibliografice.....	107
8. Obținerea bioetanolului prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a biomasei lignocelulozice de porumb autohidrolizată–delignificată.....	111
8.1. Introducere.....	111
8.2. Materiale și metode.....	115
8.2.1. Măcinarea biomasei lignocelulozice de porumb.....	115
8.2.2. Determinarea compoziției chimice a biomasei lignocelulozice de porumb.....	115
8.2.3. Pretratamentul biomasei lignocelulozice de porumb prin autohidroliza în condiții non-izoterme.....	116
8.2.4. Delignificarea fazei solide rezultată în urma pretratamentului.....	117
8.2.4.1. Delignificarea prin metoda organosolv în condiții izoterme.....	117
8.2.4.2. Delignificarea-organosolv cu trei variabile independente și trei nivele de variație.....	118

8.2.5. Hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma delignificării.....	119
8.2.6. Zaharificarea și fermentarea simultană (SSF) în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma delignificării.....	121
8.2.7. Determinarea compoziției chimice a fazei solide rezultată în urma procesului SSF.....	122
8.2.8. Analiza statistică a datelor experimentale.....	122
8.3. Rezultate și discuții.....	122
8.3.1. Studiul proceselor preliminare de autohidroliză, delignificare și hidroliză enzimatică a biomasei lignocelulozice de porumb.....	122
8.3.2. Studiul și optimizarea delignificării-organosolv a fazei solide rezultată în urma pretratamentului.....	128
8.3.3. Recuperarea principalelor componente din faza solidă rezultată în urma delignificării.....	135
8.3.4. Obținerea bioetanolului prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma delignificării.....	137
8.4. Concluzii parțiale.....	143
Referințe bibliografice.....	144
9. Concluzii generale.....	147
10. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective.....	148
11. Diseminarea rezultatelor cercetării.....	149

OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT

Biomasa lignocelulozică de porumb (tulpini și frunze de porumb) reprezintă cea mai mare cantitate de reziduuri rămase după recoltarea porumbului în agricultura României, cu potențial ridicat de prelucrare atât din punct de vedere economic cât și la scară industrială, în scopul obținerii bioetanolului ca sursă alternativă de combustibili.

În contextul actual al tendințelor cercetărilor privind conversia materialelor lignocelulozice reziduale în produse industriale cu valoare economică, teza de doctorat intitulată: **”Cercetări biotehnologice de obținere a bioetanolului din deșeuri lignocelulozice agroindustriale”** aduce o serie de contribuții originale cu privire la studiul obținerii bioetanolului din biomasa lignocelulozică de porumb (tulpini și frunze de porumb), prin aplicarea unor procese eficiente de autohidroliză, delignificare, zaharificare și fermentare simultană (engl. *Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF*), precum și prin utilizarea unor metode moderne de optimizare prin intermediul metodologiei suprafeței de răspuns (engl. *Response surface methodology, RSM*) și analiză prin intermediul cromatografiei de lichide de înaltă performanță (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*).

În acest context, strategia de cercetare a vizat parcurgerea următoarelor obiective științifice:

- Analiza compoziției chimice a biomasei lignocelulozice de porumb prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC), în vederea determinării compușilor esențiali, cu rol de substrat în procesul de fermentare.
- Pretratamentul hidrotermic a biomasei lignocelulozice de porumb prin autohidroliza în condiții non-izoterme, în vederea solubilizării fracțiunii hemicelulozice și obținerii unor compuși derivați valoroși.
- Delignificarea prin metoda organosolv în condiții izoterme a biomasei lignocelulozice de porumb pretrată, în vederea degradării ligninei și obținerii unui solid bogat în celuloză, precum și optimizarea procesului de delignificare-organosolv prin intermediul metodei analizei suprafeței de răspuns (RSM).
- Obținerea glucozei prin hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma pretratamentelor prin autohidroliză și delignificare-organosolv.

- Obținerea bioetanolului prin zaharificarea și fermentarea simultană (SSF) în regim discontinuu (engl. *batch*) și semicontinuu (engl. *fed-batch*) a fazei solide rezultată în urma proceselor de autohidroliză și delignificare, precum și optimizarea procesului SSF aplicând metoda analizei suprafeței de răspuns (RSM).

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat este structurată în două părți, după cum urmează: I) Studiul documentar care conține 6 capitole și II) Partea experimentală structurată în 5 capitole. Teza de doctorat conține 31 de figuri și 30 de tabele.

I) **STUDIUL DOCUMENTAR** este structurat în 6 capitole care fac referire la:

- **Capitolul 1**, intitulat **Structura și compoziția chimică a materialelor lignocelulozice**, prezintă principalele componente structurale ale peretelui celular (celuloza, hemiceluloza și lignina), precum și compoziția chimică a diferitelor materiale lignocelulozice folosite pentru obținerea bioetanolului.
- **Capitolul 2**, intitulat **Procesul biochimic de conversie a materialelor lignocelulozice în bioethanol**, prezintă principalele procese de transformare a biomasei lignocelulozice în bioethanol, precum și schema fluxului tehnologic de obținere a bioetanolului din materialele lignocelulozice.
- **Capitolul 3**, intitulat **Pretratamentele materialelor lignocelulozice**, este structurat în 2 subcapitole care prezintă caracterizarea proceselor fizico-chimice și chimice de fracționare a materialelor lignocelulozice precum și un studiu comparativ a principalelor metode de pretratament pentru îmbunătățirea hidrolizei enzimatic.
- **Capitolul 4**, intitulat **Hidroliza enzimatică a materialelor lignocelulozice**, este structurat în 2 subcapitole care descriu sistemele enzimatic (celulaza și hemiceluloza) capabile să hidrolizeze principalele componente a materialelor lignocelulozice (celuloza și hemiceluloza) precum și o analiză comparativă referitoare la diferitele microorganisme cu cea mai mare activitate specifică pentru complexul enzimatic.
- **Capitolul 5**, intitulat **Fermentarea materialelor lignocelulozice**, prezintă microorganismele care produc cantități semnificative de bioethanol precum și o analiză comparativă a principalelor microorganisme folosite pentru conversia materialelor lignocelulozice în etanol.

- **Capitolul 6**, intitulat **Integrarea proceselor tehnologice**, este structurat în 3 subcapitole care descriu modalitățile prin care metodele de hidroliză enzimatică și fermentare pot fi cuplate în diferite configurații de procese tehnologice, precum și o analiză comparativă referitoare la producția de bioetanol din materiale lignocelulozice folosind aceste tehnologii moderne.
- II) **PARTEA EXPERIMENTALĂ** care cuprinde rezultatele cercetărilor originale realizate pe parcursul stagiului de doctorat este structurată în 5 capitole, după cum urmează:
- **Capitolul 7**, intitulat **Obținerea bioetanolului de a doua generație prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim discontinuu și semicontinuu a biomasei lignocelulozice de porumb pretratată hidrotermic**, prezintă rezultatele cercetărilor privind evaluarea posibilității de a utiliza biomasa lignocelulozică de porumb ca materie primă pentru o tehnologie bazată pe două etape majore: autohidroliza (care conduce la recuperarea glucidelor derivate din hemiceluloză) și zaharificarea și fermentarea simultană (SSF) a fazei solide rezultată în urma pretratamentului, în vederea obținerii bioetanolului. Autohidroliza (pretratament hidrotermic) a fost efectuată în condiții non-izoterme, la temperaturi cuprinse între 180÷223 °C, iar faza solidă rezultată în urma pretratamentului biomasei lignocelulozice de porumb la temperatura optimă de 210 °C a fost folosită ca substrat pentru procesul SSF în regim discontinuu și în regim semicontinuu. Procesul SSF în regim discontinuu a fost efectuat într-o varietate de condiții experimentale (raport lichid-solid (*RLS*) = 6÷12 g lichid/g subst. uscată substrat; raport celulază-substrat (*RCS*) = 4÷16 unități/g subst. uscată substrat; raport β-glucozidază-substrat = 50 unități/g subst. uscată substrat) și optimizat aplicând metoda analizei suprafeței de răspuns (RSM). Procesul SSF în regim semicontinuu a fost realizat în condiții operaționale definite prin: *RLS* = 3÷5 g lichid/g subst. uscată substrat; *RCS* = 5÷10 unități/g subst. uscată substrat; și raport β-glucozidază-substrat = 50 unități/g subst. uscată substrat.
 - **Capitolul 8**, intitulat **Obținerea bioetanolului prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a biomasei lignocelulozice de porumb autohidrolizată–delignificată**, prezintă rezultatele investigațiilor privind obținerea bioetanolului din biomasa lignocelulozică de porumb utilizând etapele secvențiale de pretratament prin autohidroliză (pentru solubilizarea hemicelulozei) și delignificare prin metoda organosolv (pentru degradarea ligninei și obținerea unei faze solide

bogată în celuloză), prin intermediul procesului de zaharificare și fermentare simultană (SSF) în regim semicontinuu. Autohidroliza a fost efectuată în condiții non-izoterme, la temperaturi cuprinse între 180÷200 °C, iar solidele autohidrolizate au fost supuse tratamentului de delignificare izotermă prin metoda organosolv, folosind diferite condiții operaționale (temperatura delignificării în intervalul 180÷200 °C și concentrația de etanol în intervalul 30÷70 g etanol/100 g soluție etanol-apă). Procesul de delignificare a fost optimizat aplicând metoda analizei suprafeței de răspuns (RSM). Faza solidă rezultată în urma delignificării a fost folosită ca substrat pentru procesul SSF în regim semicontinuu, în condiții operaționale definite prin: raport lichid-solid $RLS = 4$ g lichid/g subst. uscată substrat; raport celuloză-substrat $RCS = 10$ unități/g subst. uscată substrat; raport β -glucozidază-substrat = 50 unități/g subst. uscată substrat.

- **Capitolul 9**, intitulat **Concluzii generale**, prezintă principalele concluzii ale rezultatelor cercetărilor realizate, cu valoare științifică și aplicativă pentru obținerea bioetanolului din biomasa lignocelulozică de porumb.
- **Capitolele 10 și 11** prezintă **Contribuțiile originale** ale tezei de doctorat, cu impact în dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspectivele de continuare a cercetărilor, precum și **Diseminarea rezultatelor** obținute pe parcursul stagiului de doctorat.

Pentru îndeplinirea activităților de cercetare, în acord cu obiectivele științifice formulate, s-au utilizat infrastructurile de cercetare ale laboratoarelor:

- *Centrul integrat de cercetare și formare pentru Biotehnologie Aplicată în Industria Alimentară, Platforma Bioaliment (www.bioaliment.ugal.ro), Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați, Romania.*
- *Laboratoarele de cercetare din cadrul Departamentului de Inginerie Chimică, Facultatea de Științe, Universitatea din Vigo, Ourense, Spania.*

Rezultatele obținute în cadrul studiilor doctorale au fost diseminate prin elaborarea a patru lucrări științifice, dintre care 2 articole în curs de publicare în reviste cotate ISI (*Industrial & Engineering Chemistry Research (ACS Publications)* și *Energy & Fuels (ACS Publications)*) și 2 articole publicate într-o revistă indexată în baze de date internaționale (*The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*). Totodată, pe parcursul stagiului doctoral, au fost comunicate rezultatele cercetărilor la 4 conferințe internaționale.

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ

7. Obținerea bioetanolului de a doua generație prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim discontinuu și semicontinuu a biomasei lignocelulozice de porumb pretratată hidrotermic

7.1. Introducere

Acest studiu oferă o evaluare experimentală a producției de bioetanol de a doua generație din biomasa lignocelulozică de porumb pretratată hidrotermic, folosind două sisteme diferite: procesul SSF în regim discontinuu și procesul SSF în regim semicontinuu. Materia primă a fost supusă pretratamentului prin autohidroliză într-o varietate de condiții operaționale. Deoarece faza solidă pretratată la temperatura maximă de 210 °C a furnizat cele mai bune rezultate pentru scopul acestui studiu, a fost utilizată cu succes ca substrat pentru procesul SSF. În procesul SSF realizat în regim semicontinuu, substratul, enzimele și nutrienții au fost adăugate în două etape: prima încărcare la începutul fermentației (momentul zero) iar a doua încărcare după 39 ore de fermentare (cu enzimele numai pentru jumătate din experimente).

7.2. Materiale și metode

7.2.1. Măcinarea biomasei lignocelulozice de porumb

Biomasa lignocelulozică de porumb (tulpini și frunze de porumb) a fost colectată dintr-o plantație din nord-vestul Spaniei (Ourense), măcinată în două etape cu două utilaje distincte: o măcinare grosieră până la un diametru de aprox. 10 cm și o măcinare fină până la un diametru de aprox. 8 mm (conform metodelor TAPPI T 264 cm-07 și ASTM E1757-01, 2007, adaptate pentru prezentul studiu), uscată în aer, omogenizată într-un singur lot pentru a evita diferențele de compoziție și depozitată într-un loc întunecat și uscat până la utilizarea în procesele ulterioare.

7.2.2. Determinarea compoziției chimice a biomasei lignocelulozice de porumb

Biomasa lignocelulozică de porumb a fost analizată pentru determinarea conținutului de umiditate (conform metodei TAPPI T 264 cm-07, adaptată pentru prezentul studiu), cenușă (conform metodelor TAPPI T 211 om-12 și ASTM E1755-01, 2007, adaptate pentru prezentul

studiu), substanțe extractibile (conform metodelor TAPPI T 264 cm-07 și ASTM E1690-08, 2006, adaptate pentru prezentul studiu) și supusă procesului de hidroliză acidă cantitativă (QAH) realizat în două etape: i) cu 72% acid sulfuric (pentru conversia poliglucidelor în oligomeri) și ii) cu 4% acid sulfuric (pentru conversia oligomerilor în monomeri) (conform metodelor TAPPI T 249 cm-09 și ASTM E1758-01, 2007, adaptate pentru prezentul studiu). Faza lichidă rezultată în urma hidrolizei acide a fost filtrată prin membrane cu dimensiunea porilor de 0,45 μm și analizată prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) (utilizând cromatograful Agilent Technologies 1100 Series cu detector cu indice de refracție și coloană Bio-Rad Aminex HPX-87H) pentru determinarea concentrației de glucide (glucoză, xiloză, arabinoză) și acid acetic. În funcție de concentrația de glucide și acid acetic a fost calculat conținutul de glucan, xilan, arabinan și grupări acetil prezent în materia primă. Reziduul solid rezultat în urma procesului de hidroliză acidă a fost cuantificat și considerat lignină Klason (Milne *et al.*, 1990; Wyman, 1996).

7.2.2.7. Identificarea și cuantificarea compușilor esențiali prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Analizele au fost efectuate folosind un cromatograf de lichide de înaltă performanță (Agilent Technologies 1100 Series, Agilent Technologies, Inc., USA) echipat cu pompă cuaternară (model G1311A), degazor cu vacuum (model G1322A), unitate de termostatare a coloanei și autosampler.

Condițiile analitice utilizate au constat într-un detector cu indice de refracție (model G1362A) și o coloană Bio-Rad Aminex HPX-87H (model G1316A) care a permis utilizarea unei eluții izocratice (compoziția fazei mobile a rămas constantă pe tot parcursul procesului de separare), folosind ca fază mobilă o soluție de acid sulfuric (H_2SO_4) 0,01 M.

Separarea compușilor a fost realizată la o temperatură a coloanei de 50 $^\circ\text{C}$, un debit (viteză de curgere) de 0,6 mL/min și un volum de injecție de 5 μL . Temperatura unității optice (detectorului cu indice de refracție) a fost de 35 $^\circ\text{C}$, presiunea maximă a pompei de 150 bari și timpul de retenție a compușilor de interes între 20=60 minute (în funcție de compusul cuantificat). Integrarea picurilor cromatografice a fost realizată cu ajutorul unui computer (Hewlett–Packard, model LE1901w) echipat cu software pentru controlul și evaluarea datelor (Agilent ChemStation, Agilent Technologies, Inc., USA).

Cromatograma HPLC rezultată în urma analizei soluției standard pentru determinarea glucidelor (glucoză, xiloză, arabinoză), acidului acetic și compușilor de degradare (5-hidroximetilfurfural și furfural) este prezentată în figura 7.8.

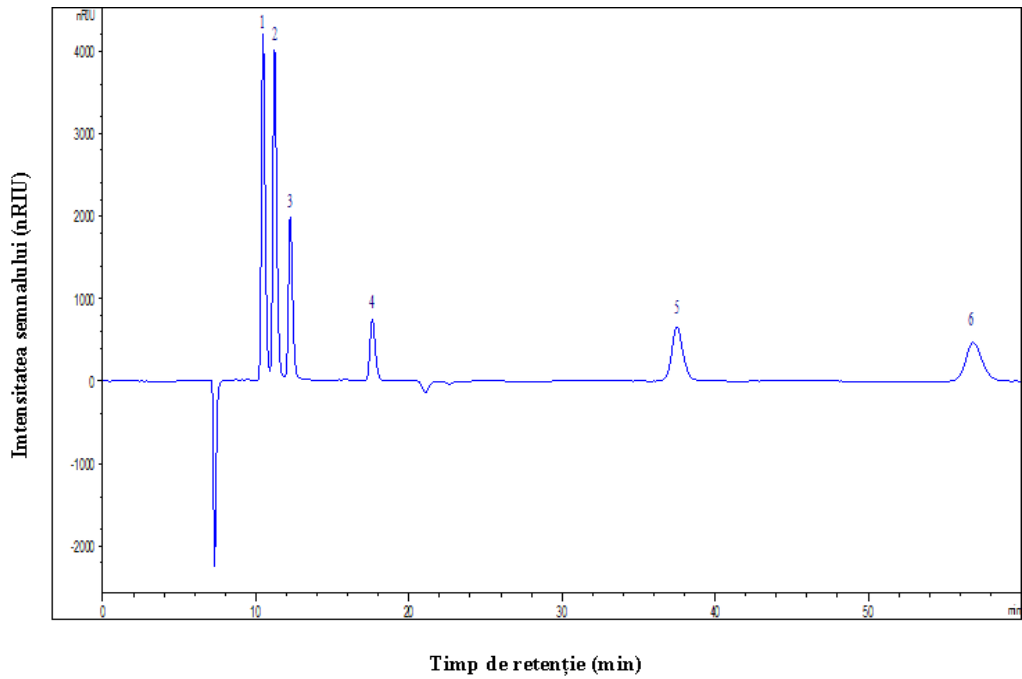


Figura 7.8. Cromatograma HPLC corespunzătoare soluției standard

(1) glucoză; (2) xiloză; (3) arabinoză; (4) acid acetic; (5) 5-hidroxi metilfurfural; (6) furfural

Cromatograma HPLC rezultată în urma analizei soluției standard pentru determinarea glucidelor (glucoză, xiloză), acidului acetic și etanolului este prezentată în figura 7.9.

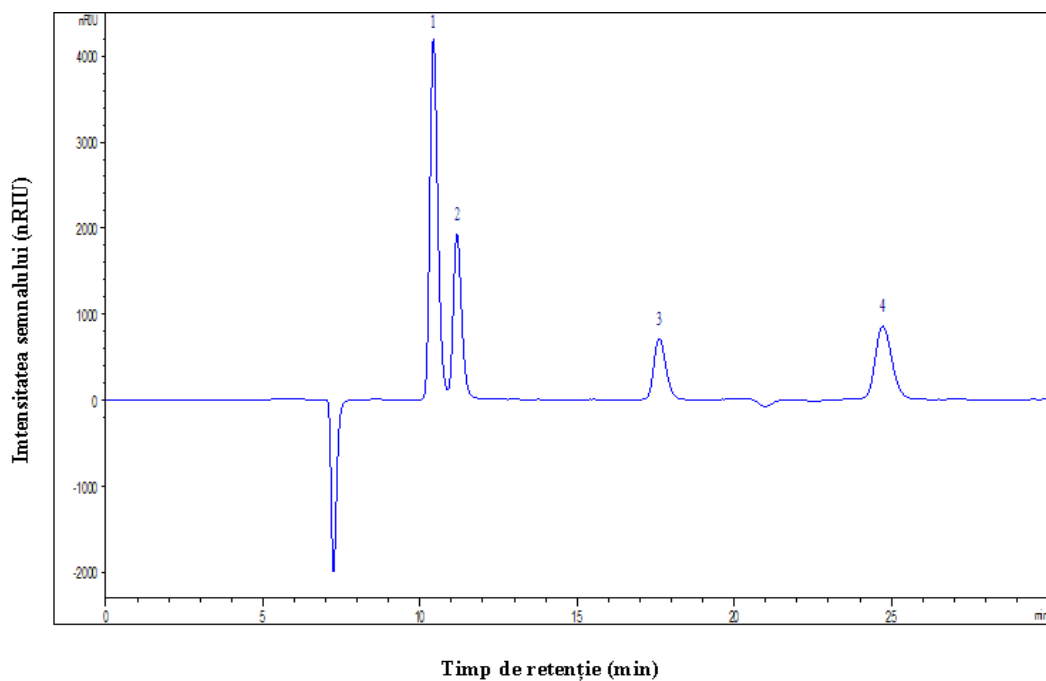


Figura 7.9. Cromatograma HPLC corespunzătoare soluției standard

(1) glucoză; (2) xiloză; (3) acid acetic; (4) etanol

7.2.3. Pretratamentul biomasei lignocelulozice de porumb

7.2.3.1. Pretratamentul hidrotermic prin autohidroliza în condiții non-izoterme

Pretratamentul hidrotermic prin autohidroliza în condiții non-izoterme a fost propus pentru solubilizarea fracției hemicelulozice din materia primă.

Procedeul experimental a constat în următoarele: biomasa lignocelulozică de porumb și apa distilată au fost introduse într-un reactor sub presiune cu un volum intern de 3,75 L (Parr 4842 model nr. 4551, Parr Instruments Company, Moline, Illinois, USA), prevăzut cu un rotor cu patru lame, încălzit de o manta externă și răcit cu apă printr-o buclă internă. Amestecul a fost omogenizat la 150 rpm, un raport lichid-solid (RLS) = 10 g apă distilată/g subst. uscată materie primă, la temperaturi de 180 °C; 190 °C; 195 °C; 200 °C; 205 °C; 210 °C; 215 °C și 223 °C, în vederea acoperirii unei arii extinse de condiții de hidroliză care conduc la formarea compușilor solubili valoroși derivați din fracțiunea hemicelulozică.

7.2.3.2. Determinarea severității pretratamentului

Severitatea pretratamentului reprezintă efectul combinat al temperaturii și timpului de reacție de-a lungul perioadelor de încălzire și răcire.

Intensitatea pretratamentului a fost exprimată sub formă de ”severitate” (S_0), unitate adimensională definită ca logaritm al factorului de severitate (R_0 , min) (Lavoie *et al.*, 2010).

7.2.4. Determinarea compoziției chimice a biomasei lignocelulozice de porumb rezultată în urma pretratamentului

Biomasa lignocelulozică de porumb pretrată hidrotermic prin autohidroliza în condiții non-izoterme a fost filtrată prin hârtie de filtru, obținându-se două faze: lichidă și solidă. O parte din faza lichidă a fost filtrată prin membrane de 0,45 μm și analizată direct prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) în vederea determinării conținutului de glucide (glucoză, xiloză, arabinoză), compuși volatili (acid acetic) și compuși de degradare a glucidelor (5-hidroximetilfurfural și furfural). Faza lichidă a fost deasemenea analizată pentru determinarea conținutului de compuși non-volatili, prin uscarea în etuvă, la temperatura de 105 °C, timp de aprox. 24÷36 ore (conform metodelor TAPPI T 412 om-11 și ASTM E1756-08, adaptate pentru prezentul studiu). În cele din urmă, faza lichidă a fost supusă posthidrolizei cu 4% acid sulfuric, la temperatura de 121 °C, timp de 40 minute (pentru conversia oligomerilor în monomeri), iar hidrolizatul rezultat a fost filtrat prin membrane cu dimensiunea porilor de 0,45 μm și analizat prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) pentru determinarea concentrației de monomeri (glucoză, xiloză, arabinoză), acid

acetic, 5-hidroximetilfurfural și furfural. În funcție de concentrația de monomeri și acid acetic din proba analizată a fost calculat conținutul de oligomeri solubili prezenți în lichidul autohidrolizat (gluco-oligomeri, xilo-oligomeri, arabino-oligomeri și grupări acetil legate de oligomeri). Faza solidă rezultată în urma pretratamentului a fost spălată cu apă distilată și cântărită la balanța analitică în vederea determinării randamentului autohidrolizei (recuperarea fazei solide după pretratament). O parte din faza solidă a fost uscată în aer, a fost supusă hidrolizei acide și analizată prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) în vederea determinării conținutului de poliglucide (glucan, xilan, arabinan) și grupări acetil. Reziduul solid rezultat în urma hidrolizei acide a fost cuantificat și considerat lignină Klason.

7.2.5. Hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma pretratamentului

Obiectivul acestui studiu a constat în analiza susceptibilității la hidroliza enzimatică a fazei solide recuperată în urma autohidrolizei biomasei lignocelulozice de porumb. Faza solidă rezultată în urma pretratamentului prin autohidroliză la temperaturi de 200 °C; 210 °C și 223 °C, a fost folosită ca substrat pentru hidroliza enzimatică realizată în baloane Erlenmeyer de 100 mL, cu un volum util de 50 mL, plasate într-un termostat cu agitare orbitală (150 rpm), la temperatura de 48,5 °C, pH = 4,85, 96 ore.

Preparatele enzimatiche comerciale utilizate: celulaza "Celluclast 1.5 L" (din *Trichoderma reesei*) și β -glucozidaza "Novozym" (din *Aspergillus niger*) au fost achiziționate de la compania Novozymes (Madrid, Spania). Mediul de cultură a fost preparat prin amestecarea principalelor componente necesare procesului: solid și apă distilată cu tampon citrat 0,05 N și preparate enzimatiche comerciale (celulază suplimentată cu β -glucozidază), în funcție de parametrii stabiliți (raport lichid-solid (RLS) cuprins între 4÷15 g lichid/g substrat, subst. uscată; raport celulază-substrat (RCS) cuprins între 2÷15 unități/g substrat, subst. uscată; și raport β -glucozidază-substrat = 50 unități/g substrat, subst. uscată).

Probele (0,5 mL) au fost prelevate la durate de timp prestabilite (între 0÷96 ore) și centrifugate la 5000 rpm, timp de 5 minute. Faza lichidă rezultată a fost filtrată prin membrane cu dimensiunea porilor de 0,45 μ m și analizată prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) pentru determinarea concentrației de glucoză.

7.2.6. Zaharificarea și fermentarea simultană (SSF) a fazei solide rezultată în urma pretratamentului

7.2.6.1. Reactivarea culturii liofilizate de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CECT-1170 (tulpina DCL 740)

Tulpina de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CECT-1170 a fost achiziționată de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (www.cect.org) (Valencia, Spania); glucoza anhidră a fost achiziționată de la Panreac Química (Barcelona, Spania); peptona bacteriologică, extractul de drojdie și extractul de malț au fost achiziționate de la Cultimed (Barcelona, Spania).

Mediul de cultură recomandat pentru reactivarea culturii liofilizate de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CECT-1170 a conținut următoarele cantități: glucoză = 10 g/L; peptonă = 5 g/L; extract de drojdie = 3 g/L; extract de malț = 3 g/L; apă distilată = 1000 mL.

Condițiile de cultivare pentru creșterea celulelor de drojdie în mediu lichid au fost următoarele: 26 °C, 150 rpm, 24 ore.

Reactivarea culturii liofilizate a constat în rehidratarea celulelor de drojdie, iar suspensia rezultată a fost folosită pentru inocularea mediului de cultură lichid, mediu care a fost incubat la temperatura și condițiile de cultivare recomandate. Inoculul rezultat în urma incubării culturii de drojdie a fost amestecat cu o soluție de glicerol de concentrație 30% pentru încorporarea celulelor, introdus în criotuburi de 2 mL cu capac înfiletabil și păstrat la temperatura de -70 °C pentru utilizarea în procesul de fermentare.

7.2.6.2. Cultivarea drojdiei și prepararea inoculului

Mediul de cultură recomandat pentru prepararea inoculului de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* folosit în procesul SSF a conținut următoarele cantități: glucoză = 10 g/L; peptonă = 5 g/L; extract de drojdie = 3 g/L; extract de malț = 3 g/L; apă distilată = 1000 mL.

Condițiile de cultivare utilizate pentru creșterea celulelor de drojdie în mediu lichid au fost următoarele: 32 °C, 200 rpm, 24 ore.

Prepararea inoculului pentru SSF a constat în inocularea mediului de cultură cu celulele de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* și incubarea la temperatura și condițiile de cultivare recomandate. După incubare, mediul de cultură a fost centrifugat la 2500 rpm, 25 °C, timp de 10 minute. Faza solidă (celulele de drojdie) rezultată a fost amestecată cu apă distilată sterilă (în funcție de cantitatea dorită) și folosită ca inocul pentru SSF.

7.2.6.3. Procesul de zaharificare și fermentare simultană în regim discontinuu

Obiectivul acestui studiu a constat în evaluarea posibilității de a utiliza biomasa lignocelulozică de porumb pretratată hidrotermic, în vederea obținerii bioetanolului de a doua generație. Optimizarea procesului de zaharificare și fermentare simultană (SSF) în regim discontinuu (engl. *batch*) a fost realizată aplicând metoda analizei suprafeței de răspuns

(RSM), folosind un design factorial experimental cu două variabile independente și trei nivele de variație (raport lichid-solid $RLS = 6; 9; \text{și } 12$ g lichid/g subst. uscată substrat și raport celulază-substrat $RCS = 4; 10; \text{și } 16$ unități/g subst. uscată substrat).

Preparatele enzimatice comerciale utilizate: celulaza "Celluclast 1.5 L" (din *Trichoderma reesei*) și β -glucozidaza "Novozym" (din *Aspergillus niger*) au fost achiziționate de la compania Novozymes (Madrid, Spania).

Procesul SSF în regim discontinuu a fost realizat în baloane Erlenmeyer de 250 mL cu un volum util de 100 mL, plasate într-un termostat cu agitare orbitală (120 rpm), la temperatura de 35 °C (pH = 5), timp de 96 ore, folosind ca substrat faza solidă rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C (severitate de 4,20). Concentrația de nutrienți folosită în procesul SSF a fost următoarea: peptonă = 5 g/L; extract de drojdie = 3 g/L; extract de malț = 3 g/L; apă distilată = 1000 mL.

Mediul de cultură a fost preparat prin amestecarea principalelor componente necesare procesului: solid și apă distilată (introduse în prealabil în autoclavă, separat de nutrienți, la temperatura de 121 °C, presiune de 20 atm, timp de 20 minute, în vederea sterilizării substratului), cu preparate enzimatice comerciale (celulază suplimentată cu β -glucozidază), nutrienți = 5 mL (peptonă, extract de drojdie, extract de malț) și inocul = 10 mL (*Saccharomyces cerevisiae* CECT-1170, cu o concentrație inițială de celule de drojdie = 1 g/L). Probele (0,5 mL) au fost prelevate la durate de timp prestabilite (între 0÷96 ore) și centrifugate la 5000 rpm, timp de 5 minute. Faza lichidă rezultată a fost filtrată prin membrane cu dimensiunea porilor de 0,20 μm și analizată prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) pentru determinarea concentrației de etanol.

7.2.6.4. Procesul de zaharificare și fermentare simultană în regim semicontinuu

Obiectivul acestui studiu a constat în obținerea bioetanolului din biomasa lignocelulozică de porumb, folosind pretratamentul prin autohidroliză în condiții non-izoterme și zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu (engl. *fed-batch*).

Preparatele enzimatice comerciale utilizate: celulaza "Celluclast 1.5 L" (din *Trichoderma reesei*) și β -glucozidaza "Novozym" (din *Aspergillus niger*) au fost achiziționate de la compania Novozymes (Madrid, Spania).

Procesul SSF în regim semicontinuu a fost realizat în baloane Erlenmeyer de 250 mL cu un volum util de 100 mL, plasate într-un termostat cu agitare orbitală (120 rpm), la temperatura de 35 °C (pH = 5), timp de 168 ore, folosind faza solidă rezultată în urma pretratamentul hidrotermic la temperatura de 210 °C (severitate de 4,20), preparate enzimatice

comerciale (celulază suplimentată cu β -glucozidază), nutrienți = 5 mL (peptonă, extract de drojdie, extract de malt) și inocul = 10 mL (*Saccharomyces cerevisiae* CECT-1170, cu o concentrație inițială de celule de drojdie = 1 g/L).

Substratul, enzimele și nutrienții au fost adăugate în două etape până la valori finale corespunzătoare încărcării la 39 ore, astfel: prima încărcare (50 %) a fost efectuată la începutul procesului (timp zero), iar a doua încărcare (50 %) după 39 ore de zaharificare și fermentare simultană (cu enzimele doar pentru experimentele 1; 2 și 3).

Probele (0,5 mL) au fost prelevate la durate de timp prestabilite (între 0÷168 ore) și centrifugate la 5000 rpm, timp de 5 minute. Faza lichidă a fost filtrată prin membrane cu dimensiunea porilor de 0,20 μ m și analizată prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) pentru determinarea concentrației de etanol.

7.2.7. Determinarea compoziției chimice a fazei solide rezultată în urma proceselor SSF

Faza solidă rezultată în urma proceselor SSF a fost uscată în aer, supusă hidrolizei acide cantitative și analizată prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) în vederea determinării conținutului de poliglucide (glucan, xilan, arabinan) și grupări acetil. Reziduul solid rezultat în urma hidrolizei acide a fost cuantificat și considerat lignină Klason.

7.2.8. Analiza statistică a datelor experimentale

Pentru analiza statistică a datelor experimentale a fost utilizat un software comercial (Microsoft Excel, Microsoft, Redmond, WA, USA). Optimizarea a fost realizată aplicând metoda analizei suprafeței de răspuns (RSM).

7.3. Rezultate și discuții

7.3.1. Analiza compoziției chimice a biomasei lignocelulozice de porumb

În urma determinărilor cantitative și analizelor efectuate prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC), s-a obținut compoziția chimică a biomasei lignocelulozice de porumb (rezultate prezentate în tabelul 7.5).

În urma analizei comparative realizate între extracțiile Soxhlet cu diferiți solvenți (apă distilată și etanol) s-a demonstrat că cea mai indicată din punct de vedere economic precum și al randamentului extracției diferitelor fracțiuni ale materialului lignocelulozic a fost extracția cu apă distilată (rezultate prezentate în tabelul 7.6).

Tabel 7.5. Compoziția chimică a biomasei lignocelulozice de porumb

Compoziție	Conținut (g/ 100 g subst. uscată MLC)*
Glucan	34,48±0,14
Xilan	14,54±0,07
Arabinan	2,16±0,06
Grupări acetil	1,93±0,02
Lignină Klason	18,49±0,21
Subst. extractibile	12,20±0,41
Cenușă	5,00±0,03
Proteine	4,25±0,22

MLC – material lignocelulozic.

* Datele sunt prezentate ca valori medii ± deviațiile standard pentru determinări realizate în 4 replicare.

Tabel 7.6. Compoziția chimică a biomasei lignocelulozice de porumb supuse extracției Soxhlet

Extracția	cu apă	cu apă și etanol	cu etanol
Subst. extractibile (g/100 g subst. uscată MLC)*	12,20±0,41	11,84±0,47	9,64±1,70
<i>Compoziția fazei solide (g/ 100 g subst. uscată SE)*</i>			
Glucan	38,14±0,16	33,96±0,74	22,92±0,88
Xilan	16,55±0,08	15,17±0,21	22,69±0,87
Arabinan	2,46±0,07	1,87±0,01	3,75±0,14
Grupări acetil	2,19±0,03	2,50±0,08	2,87±0,14
Lignină Klason	21,06±0,24	16,17±0,39	15,91±0,89
<i>Compoziția fazei lichide (g/ L)</i>			
Oligomeri	1,17	1,28	n.d
Glucoză	0,15	0,19	n.d
Xiloză	0,12	0,04	n.d
Arabinoză	0,00	0,03	n.d
Acid acetic	0,56	0,46	n.d

MLC – material lignocelulozic; SE – solid rezultat în urma extracției Soxhlet; n.d – nederminat.

* Datele sunt prezentate ca valori medii ± deviațiile standard pentru determinări realizate în triplicat.

7.3.2. Studiul pretratamentului biomasei lignocelulozice de porumb

Tabelul 7.7 cuprinde condițiile operaționale, date legate de bilanțul total de materiale (randamentul solidului și compoziții non-volatili), precum și compoziția fazelor rezultate în urma pretratamentului (faza solidă și faza lichidă).

Tabel 7.7. Condiții operaționale și rezultate experimentale privind autohidroliza biomasei lignocelulozice de porumb

t _{MAX} (°C)	180	190	195	200	205	210	215	223
Severitatea (S_0 , adimensională)	3,39	3,64	3,80	3,96	4,07	4,20	4,35	4,57
<i>Balanța de materiale (g/ 100 g subst. uscată MLC)</i>								
Randamentul autohidrolizei (R_A)	75,98	73,01	72,16	64,58	58,91	61,88	62,25	54,13
Compuși non-volatili	18,27	23,23	26,15	32,28	31,47	29,63	27,77	29,10
<i>Compoziția fazei solide (g/ 100 g subst. uscată SA)*</i>								
Glucan	40,45±0,14	43,60±0,20	48,14±0,32	50,43±0,30	54,92±0,48	55,32±0,33	58,21±0,56	61,06±0,83
Xilan	15,78±0,13	13,78±0,13	15,11±0,12	8,82±0,12	7,84±0,14	2,48±0,07	3,62±0,05	2,76±0,02
Arabinan	1,92±0,02	1,29±0,01	1,04±0,03	0,52±0,00	0,31±0,02	0,11±0,03	0,09±0,01	0,08±0,03
Grupări acetil	1,49±0,02	1,22±0,01	1,11±0,01	0,80±0,01	0,54±0,03	0,40±0,01	0,30±0,02	0,33±0,00
Lignină Klason	22,08±0,39	23,40±0,20	22,69±0,14	25,45±0,12	28,42±1,08	27,87±0,13	31,10±1,91	33,52±1,28
<i>Compoziția fazei lichide (g/L)</i>								
Gluco-oligomeri* ¹	1,67±0,00	1,78±0,02	1,62±0,01	2,57±0,08	2,53±0,03	1,15±0,02	2,40±0,04	1,11±0,02
Xilo-oligomeri* ¹	2,68±0,00	5,80±0,05	10,99±0,03	11,62±0,30	11,97±0,11	10,02±0,02	8,53±0,11	2,26±0,02
Arabino-oligomeri* ¹	0,62±0,00	0,94±0,00	0,06±0,00	0,93±0,02	0,71±0,00	0,25±0,01	0,24±0,01	0,00±0,00
Grupări acetil-oligomeri* ¹	0,14±0,01	0,38±0,03	1,48±0,00	0,59±0,08	0,59±0,00	0,21±0,01	0,47±0,04	0,28±0,01
Glucoză	0,72	0,67	0,68	0,69	0,59	0,49	0,40	0,31
Xiloză	0,29	0,27	0,28	0,56	0,59	0,78	1,32	0,78
Arabinoză	0,14	0,23	0,23	0,28	0,21	0,03	0,07	0,03
Acid acetic	1,98	2,14	2,18	2,58	2,86	3,32	3,30	1,48
Hidroximetilfurfural	< 0,01	0,01	0,01	0,05	0,01	0,00	0,04	0,12
Furfural	< 0,01	0,04	0,04	0,29	0,42	0,81	1,19	1,21

MLC – material lignocelulozic; SA – solid autohidrolizat; ¹ valoare exprimată ca echivalent monomer.

* Datele sunt prezentate ca valori medii ± deviațiile standard pentru determinări realizate în triplicat.

7.3.2.1. *Fracționarea biomasei lignocelulozice de porumb*

Conform tabelului 7.7, glucanul a prezentat valori cuprinse între 30,7÷35,1 g glucan/100 g materie primă, subst. uscată (cu o valoare medie de $32,4 \pm 1,3$ g), reprezentând 94 % din glucanul inițial, iar lignina între 15,9÷18,7 g lignină/100 g subst. uscată de materie primă (cu o valoare medie de $17,0 \pm 1,0$ g), reprezentând 92 % din lignina inițială. Aceasta confirmă faptul că glucanul și lignina au fost reținute aproape în totalitate în faza solidă, printr-o solubilizare redusă. Xilanul, arabinanul și grupările acetil sunt compuși care fac parte din hemiceluloză iar conținutul lor în faza solidă a scăzut odată cu creșterea în severitate, până la valori de: 2,76 g xilan/100 g subst. uscată solid autohidrolizat; 0,08 g arabinan/100 g subst. uscată solid autohidrolizat și 0,33 g grupări acetil/100 g subst. uscată solid autohidrolizat (la o severitate de 4,57), valori corespunzătoare unui procent de aprox. 90÷98 % din conținutul inițial al materiei prime, fapt care indică o solubilizare aproape completă a hemicelulozei.

Compușii cu cea mai mare pondere în faza lichidă au fost oligomerii derivați din hemiceluloză. Xilo-oligomerii au reprezentat cei mai abundenți compuși din faza lichidă, cu o concentrație maximă de 11,97 g/L (corespunzătoare unei severități de 4,07), urmați de gluco-oligomeri, cu o concentrație medie de aproximativ 2 g/L (fără o dependență clară de severitate). În intervalul de severitate cuprins între 3,80÷4,20, xilo-oligomerii au reprezentat între 68÷79 % din xilanul inițial, iar suma oligomerilor și monomerilor (compuși utili în etapele ulterioare de bioconversie) a reprezentat între 12,6÷15,2 % din materia primă inițială.

7.3.2.2. *Susceptibilitatea fazei solide la hidroliza enzimatică*

Fazele solide obținute în urma pretratamentului în condiții de severitate (S_0) de 3,96; 4,20 și 4,57, au fost selectate pentru hidroliza enzimatică (conform experimentelor HE1; HE2 și HE3 din tabelul 7.9). Experimentele au fost realizate în aceleași condiții favorabile (raport lichid-solid $RLS = 15$ g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat și raport celulază-substrat $RCS = 10$ unități/g subst. uscată solid autohidrolizat), în scopuri comparative. Experimentele HE4; HE5; HE6; HE7 și HE8 (conform tabelului 7.9) au fost efectuate în vederea selectării raportului lichid-solid (RLS) precum și a raportului celulază-substrat (RCS) pentru procesul de fermentare. Conform datelor anterioare, pretratamentul realizat la temperatura de 210 °C (severitate de 4,20) a fost selectat ca fiind condiția optimă, deoarece din punct de vedere al conceptului de "biorafinărie" reprezintă un compromis între recuperarea semnificativă de compuși derivați din hemiceluloză în faza lichidă (suma dintre xilo-oligomeri și xiloză a corespuns unui procent de 68 % din xilanul inițial) și obținerea unei faze solide folosită ca substrat pentru hidroliza enzimatică.

Profilele concentrației de glucoză au fost modelate cu ajutorul următoarei ecuații cinetice empirice (Holtzapple *et al.*, 1984):

$$CCG_{\tau} = CCG_{MAX} \times \frac{\tau}{\tau + \tau_{1/2}}$$

unde: CCG_{τ} – conversia celulozei în glucoză la momentul τ , %; CCG_{MAX} – conversia celulozei previzionată pentru un timp de reacție infinit, %; $\tau_{1/2}$ – timpul necesar pentru a obține o concentrație de glucoză egală cu 50 % din CCG_{MAX} , ore.

Tabelul 7.9 prezintă condițiile operaționale și rezultatele experimentale privind hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma pretratamentului hidrotermic.

Tabel 7.9. Condiții operaționale și rezultate experimentale privind hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma autohidrolizei la temperaturi de 200 °C, 210 °C și 223 °C

Exp. nr.	Variabile independente			Variabile dependente experimentale	Variabile dependente calculate prin ecuația empirică	
	S_0 (adimensională)	RLS (g/g)	RCS (unități/g)	CCG_{96} (%)	$\tau_{1/2}$ (ore)	CCG_{MAX} (%)
HE1	3,96	15	10	78,1±2,9	6,6±0,2	74,2±2,1
HE2	4,20	15	10	91,4±5,1	4,9±0,4	91,8±4,6
HE3	4,57	15	10	92,8±2,7	5,4±0,3	94,2±1,1
HE4	4,20	4	2	17,9±0,5	-	-
HE5	4,20	4	5	17,0±0,0	-	-
HE6	4,20	8	2	58,7±2,6	18,3±0,1	69,9±3,2
HE7	4,20	8	5	74,4±3,3	13,4±0,1	85,0±2,3
HE8	4,20	10	15	86,1±3,3	4,1±0,8	87,9±3,5

* Datele sunt prezentate ca valori medii ± deviațiile standard pentru determinări realizate în 2–4 replicare.

Figura 7.12 prezintă variația concentrației de glucoză în funcție de timp. Conform acesteia, concentrația de glucoză a crescut rapid în primele 10 ore. La 96 ore de hidroliză enzimatică, conversia celulozei în glucoză (CCG_{96}) a variat de la 78,1 % (în experimentul HE1), până la 91,4 % (în experimentul HE2) și 92,8 % (în experimentul HE3). S-a dovedit faptul că valorile obținute pentru CCG_{MAX} de 74,2 % (în experimentul HE1), 91,8 % (în experimentul HE2) și 94,2 % (în experimentul HE3), au fost aproximativ asemănătoare cu valorile obținute pentru CCG_{96} . Experimentele au fost caracterizate printr-un timp de reacție

foarte scurt ($\tau_{1/2}$) de 6,6 ore (în experimentul HE1), 4,9 ore (în experimentul HE2) și 5,4 ore (în experimentul HE3) datorită cineticii favorabile a etapelor inițiale de hidroliză.

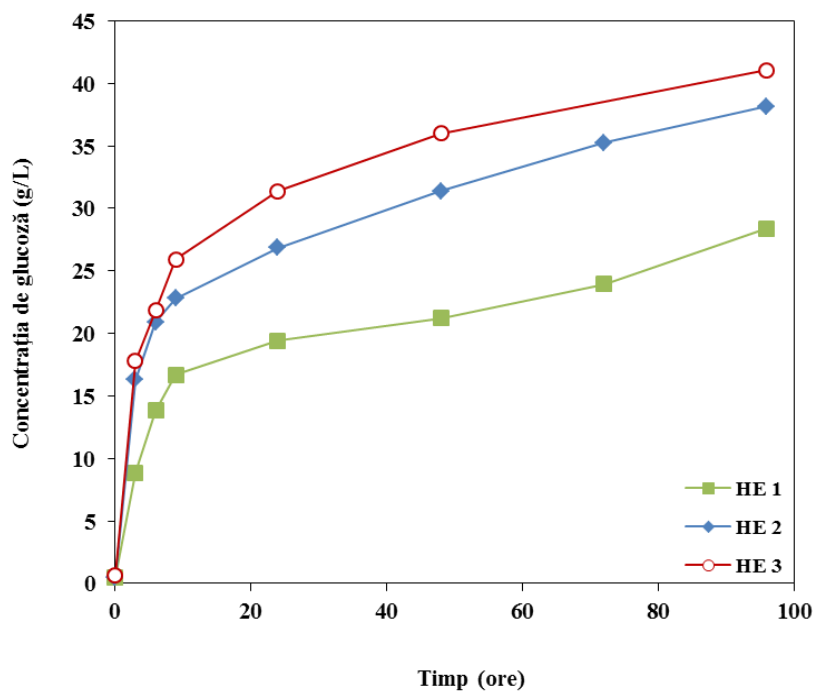


Figura 7.12. Evoluția în timp a concentrației de glucoză corespunzătoare hidrolizei enzimatice a fazei solide rezultată în urma autohidrolizei la temperaturi de 200 °C, 210 °C și 223 °C, pentru experimentele HE1, HE2 și HE3

7.3.3. Studiul și optimizarea zaharificării și fermentării simultane în regim discontinuu a fazei solide rezultată în urma pretratamentului

Deoarece solidul autohidrolizat (SA) rezultat în urma pretratamentului la temperatura de 210 °C (severitate = 4,20) a furnizat cele mai bune rezultate, a fost selectat ca substrat pentru procesul SSF în regim discontinuu, în intervale de variație care acoperă condițiile de practică și interesul economic (raport lichid-solid $RLS = 6; 9; \text{și } 12$ g lichid/g subst. uscată substrat; raport celulază-substrat $RCS = 4; 10; \text{și } 16$ unități/g subst. uscată substrat; și raport β -glucozidază-substrat = 50 unități/g subst. uscată substrat).

Figura 7.13 prezintă variația concentrației de etanol în funcție de timp, concentrație care a crescut rapid în prima parte a procesului SSF. Cea mai mare valoare a concentrației de etanol a fost atinsă în experimentul 3 (definit prin raport lichid-solid $RLS = 6$ g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat și raport celulază-substrat $CSR = 16$ unități/g subst. uscată solid autohidrolizat), cu un maxim de 37,75 g etanol/L, valoare similară cu cea considerată drept prag pentru rentabilitatea economică (30÷40 g etanol/L) (Wingren *et al.*, 2003).

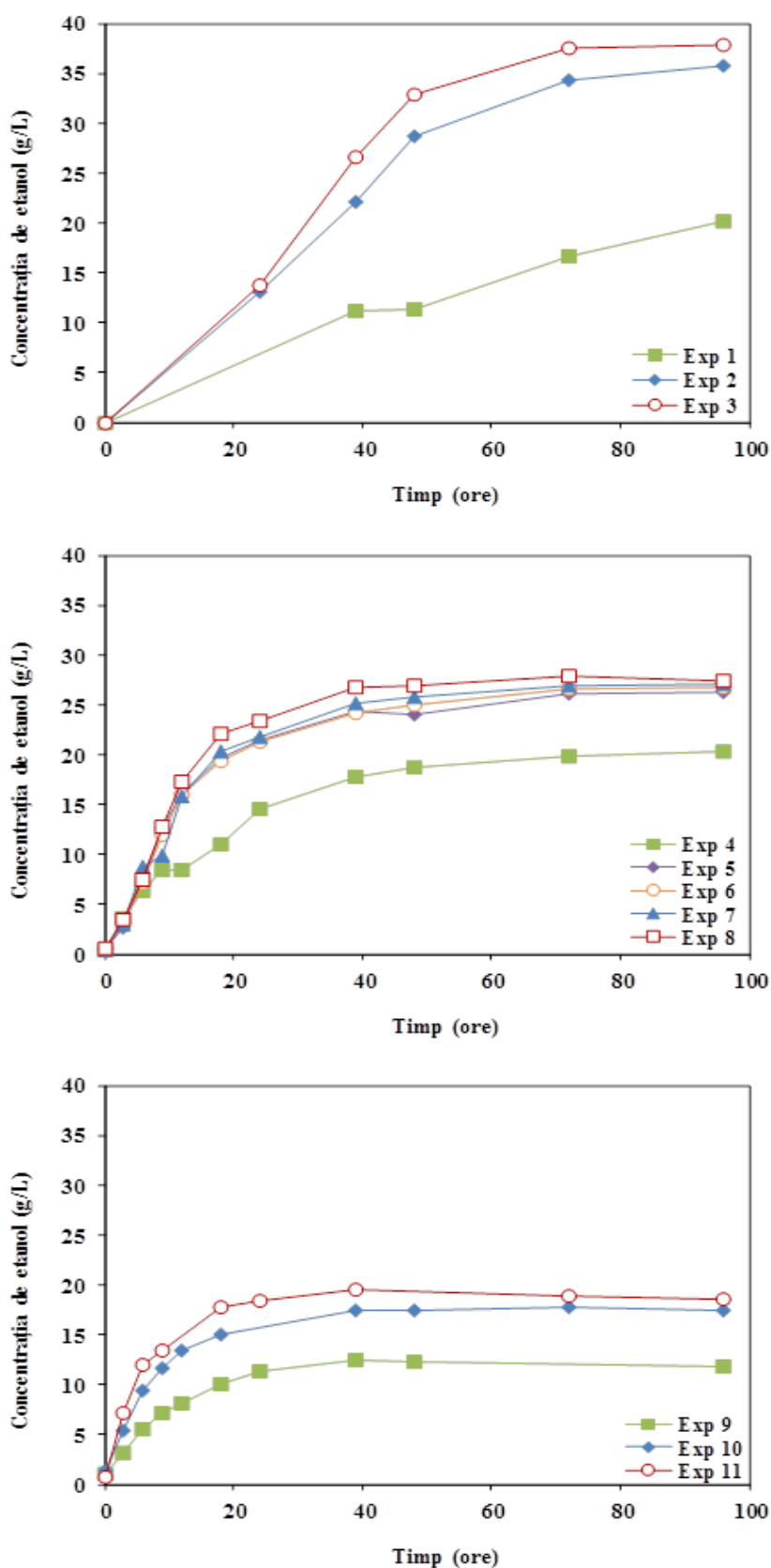


Figura 7.13. Evoluția în timp a concentrației de etanol corespunzătoare zaharificării și fermentării simultane în regim discontinuu a fazei solide rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C

Tabel 7.11. Condiții operaționale și rezultate experimentale privind zaharificarea și fermentarea simultană în regim discontinuu a fazei solide rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C

Exp. nr.	Variabile independente dimensionale		Variabile independente adimensionale		Variabile dependente dimensionale		Variabile dependente calculate de modelul empiric		Variabile dependente experimentale*				
	<i>RLS</i> (g/g)	<i>RCS</i> (unități/g)	x_1	x_2	E_{MAX} (y_1)	CE (y_2)	E_{MAXCal} (y_3)	CE_{Cal} (y_4)	Gn (y_5)	Xn (y_6)	Arn (y_7)	GAc (y_8)	LK (y_9)
1	6	4	-1	-1	20,12	42,83	21,94	46,02	50,37±0,53	3,89±0,04	0,18±0,01	0,42±0,09	36,02±0,49
2	6	10	-1	0	35,76	76,12	33,42	72,80	42,93±0,71	3,74±0,09	0,22±0,01	0,47±0,04	42,58±0,82
3	6	16	-1	1	37,75	80,37	38,27	80,49	38,24±0,42	3,78±0,07	0,19±0,01	0,51±0,06	46,10±0,61
4	9	4	0	-1	20,25	62,35	18,50	58,30	48,72±0,66	4,18±0,06	0,16±0,01	0,43±0,05	38,05±0,53
5	9	10	0	0	26,20	80,65	26,97	82,76	31,21±0,73	12,77±0,32	2,18±0,07	2,45±0,04	45,80±1,26
6	9	10	0	0	27,09	83,41	26,97	82,76	31,69±0,32	12,97±0,12	2,22±0,03	2,49±0,03	46,20±1,66
7	9	10	0	0	26,72	82,27	26,97	82,76	31,37±0,99	12,79±0,38	2,18±0,04	2,46±0,05	47,03±1,50
8	9	16	0	1	27,95	86,05	28,81	88,14	31,32±0,74	12,78±0,29	2,18±0,04	2,46±0,02	47,45±0,94
9	12	4	1	-1	13,88	50,20	13,81	51,01	31,14±0,92	12,69±0,38	2,16±0,07	2,47±0,03	39,35±1,98
10	12	10	1	0	17,82	71,81	19,27	73,16	30,78±0,00	12,50±0,00	2,10±0,00	2,44±0,00	43,96±0,00
11	12	16	1	1	19,47	78,44	18,10	76,23	31,04±0,00	12,62±0,00	2,12±0,00	2,45±0,00	46,58±0,00

* Datele sunt prezentate ca valori medii ± deviațiile standard pentru determinări realizate în triplicat.

Table 7.12. Coeficienții de regresie și parametrii statistici pentru corelația și semnificația modelului

Parametri	E_{MAX} (y_1)	CE (y_2)
<i>Coeficienți de regresie</i>		
b_0	26,97***	82,8***
b_1	-7,08***	-0,18
b_2	5,15***	14,9***
b_{11}	-3,01**	-2,31
b_{22}	-0,624	-9,78***
b_{12}	-3,31**	-9,55***
<i>Parametri statistici</i>		
R^2	0,968	0,973
F	30,2	36,7
<i>Nivel semnificativ</i>	> 99%	> 99%

** Coeficient semnificativ pentru nivel de încredere de 95%; *** Coeficient semnificativ pentru nivel de încredere de 99%; R^2 – corelația; F – parametrul Fisher.

Tabelul 7.11 prezintă condițiile operaționale și rezultatele obținute pentru modelul experimental propus, iar tabelul 7.12 prezintă coeficienții de regresie $b_{0j}...b_{ikj}$ și semnificația acestora, precum și parametrii statistici care măsoară corelația și semnificația modelului.

Variabilele independente propuse au fost: raportul lichid-solid (RLS sau x_1) și raportul celulază-substrat (RCS sau x_2), iar variabilele dependente au inclus: concentrația maximă de etanol (E_{MAX} sau y_1 , g etanol/L) și conversia glucanului în etanol (CE sau y_2 , g etanol/100 g etanol potențial). Corelația dintre variabilele independente și variabilele dependente a fost stabilită prin intermediul unui model empiric, cu o ecuație polinomială de gradul doi:

$$y_j = b_{0j} + \sum_i b_{ij}x_j + \sum_i \sum_k b_{ikj}x_jx_k$$

unde: y_j – variabila dependentă considerată ($j = 1\div 2$); x_i sau x_k (i sau $k = 1\div 2$, $k \geq i$) – variabile independente adimensionale; $b_{0j}...b_{ikj}$ – coeficienții de regresie, calculați din datele experimentale prin regresii multiple.

Faza solidă rezultată în urma zaharificării și fermentării simultane în regim discontinuu a fost recuperată în vederea caracterizării chimice a biomasei lignocelulozice de porumb și determinării compușilor esențiali rămași în urma procesului: glucan (Gn sau y_5 , g glucon/100 g substrat), xilan (Xn sau y_6 , g xilan/100 g substrat), arabinan (Arn sau y_7 , g

arabinan/100 g substrat), grupări acetil (GAc sau y_8 , g grupări acetil/100 g substrat), lignină Klason (LK sau y_9 , g lignină Klason/100 g substrat) (rezultate prezentate în tabelul 7.11).

Conversia maximă a glucanului în etanol (CE) a variat între 42,83 % (în experimentul 1, efectuat la cel mai mic raport lichid-solid $RLS = 6$ g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat și cel mai mic raport celulază-substrat $RCS = 4$ unități/g subst. uscată solid autohidrolizat) și 86,05 % (în experimentul 8, efectuat la un raport lichid-solid $RLS = 9$ g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat și la cel mai ridicat raport celulază-substrat $RCS = 16$ unități/g subst. uscată solid autohidrolizat).

Figura 7.14 prezintă suprafața de răspuns pentru dependența concentrației maxime de etanol (E_{MAX} , g etanol/L) față de raportul lichid-solid (RLS , g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat) și raportul celulază-substrat (RCS , unități/g subst. uscată solid autohidrolizat).

Cea mai influentă variabilă pentru E_{MAX} a fost raportul lichid-solid (RLS), în timp ce influența raportului celulază-substrat (RCS) s-a observat doar la un RLS scăzut, din cauza limitărilor de transfer de masă în condiții experimentale definite prin cantități ridicate de solide. Cea mai ridicată valoare predicționată pentru concentrația maximă de etanol a fost cea realizată în condițiile experimentului 3 ($RLS = 6$ g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat și $RCS = 16$ unități/g subst. uscată solid autohidrolizat), cu un maxim de 38,27 g etanol/L, pentru $E_{MAX} = 37,75$ g etanol/L.

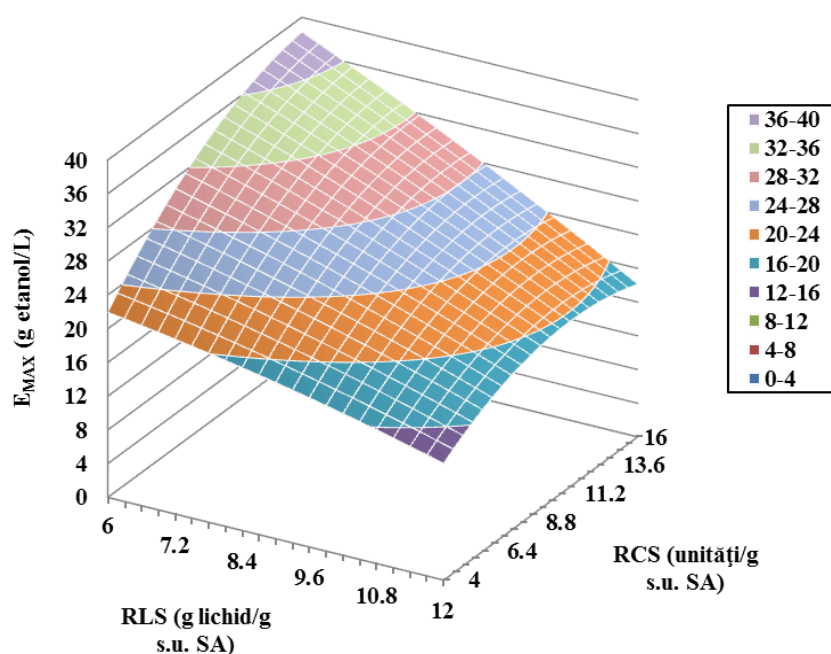


Figura 7.14. Suprafața de răspuns pentru dependența concentrației maxime de etanol (E_{MAX} , g etanol/L) față de raportul lichid-solid (RLS , g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat (SA)) și raportul celulază-substrat (RCS , unități/g subst. uscată solid autohidrolizat (SA))

Figura 7.15 prezintă suprafața de răspuns pentru dependența conversiei maxime a glucanului în etanol (CE , g etanol/100 g etanol potențial) față de raportul lichid-solid (RLS , g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat) și raportul celuloză-substrat (RCS , unități/g subst. uscată solid autohidrolizat).

Cea mai influentă variabilă s-a dovedit a fi raportul celuloză-substrat (RCS), conform parametrilor statistici prezentați în tabelul 7.12. Cea mai ridicată valoare predicționată pentru conversia glucanului în etanol a fost de 88,7 %, obținută în condiții de $RLS = 8,7$ g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat și $RCS = 14,8$ unități/g subst. uscată solid autohidrolizat.

Aceste condiții sunt foarte asemănătoare cu cele din experimentul 8 (efectuat la $RLS = 9$ g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat și $RCS = 16$ unități/g subst. uscată solid autohidrolizat), în care a fost obținută o conversie maximă a glucanului în etanol de 86,05 %, valoare comparativă cu cea calculată de model ($CE_{Cal} = 88,14$ %), cu o abatere de doar 2,4 %. Aceste rezultate confirmă validarea valorilor experimentale de către modelul empiric.

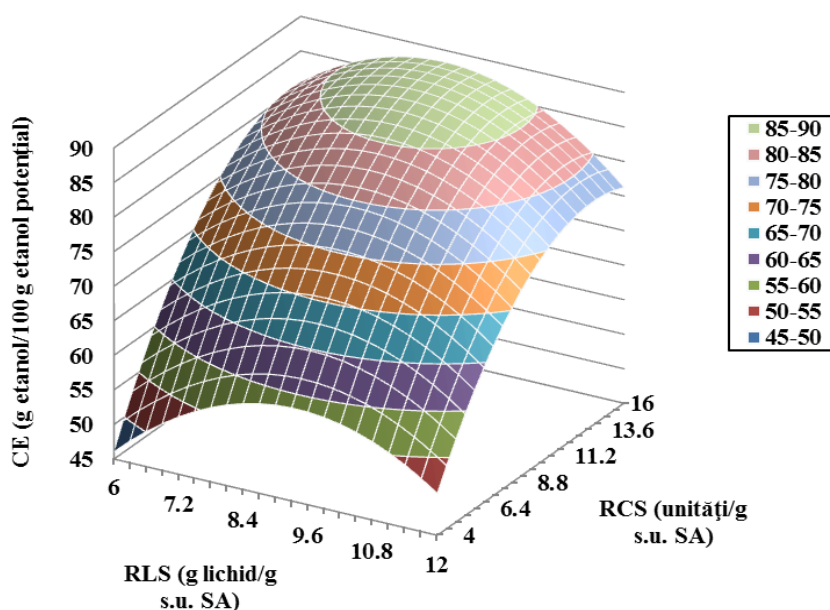


Figura 7.15. Suprafața de răspuns pentru dependența conversiei maxime a glucanului în etanol (CE , g etanol/100 g etanol potențial) față de raportul lichid-solid (RLS , g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat (SA) și raportul celuloză-substrat (RCS , unități/g subst. uscată solid autohidrolizat (SA)

7.3.4. Obținerea bioetanolului prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma pretratamentului

Zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a fost studiată în scopul îmbunătățirii rezultatelor experimentale obținute în secțiunea 7.3.3.

Pentru atingerea obiectivului propus au fost elaborate două strategii experimentale, astfel:

- Prima strategie a presupus încărcarea a 50% din cantitatea de substrat, enzime și nutrienți la începutul procesului SSF (momentul zero), iar după 39 ore de fermentare, adăugarea restului de 50% din cantitatea de substrat, enzime și nutrienți (pentru experimentele 1; 2 și 3, conform tabelului 7.14).
- A doua strategie a presupus aceleași condiții, dar fără adaos de enzime după 39 ore de fermentare (pentru experimentele 4; 5 și 6, conform tabelului 7.14).

Pentru obținerea unei concentrații maxime de etanol (E_{MAX} sau y_1 , g/L) precum și a unei conversii ridicate a glucanului în etanol (CE sau y_2 , %) au fost selectate valori finale ale raportului lichid-solid (RLS_F) de 3; 4 și 5 g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat, corespunzătoare RLS după încărcarea la 39 ore, valori mult mai scăzute decât cele folosite în procesul SSF în regim discontinuu.

Valoarea finală pentru raportul celulază-substrat (RCS_F) a fost de 10 unități/g subst. uscată substrat (corespunzătoare RCS după încărcarea la 39 ore), selectată pentru experimentele 1; 2 și 3. În experimentele 4; 5 și 6, enzimele au fost adăugate doar la momentul zero, valoarea RCS_F fiind de 5 unități/g subst. uscată solid autohidrolizat pe tot parcursul procesului.

Recuperarea fazei solide rezultată în urma zaharificării și fermentării simultane în regim semicontinuu a fost realizată în vederea caracterizării chimice a biomasei lignocelulozice de porumb și determinării compușilor esențiali rămași în urma procesului: glucan (Gn sau y_3 , g glucan/100 g substrat), xilan (Xn sau y_4 , g xilan/100 g substrat), arabinan (Arn sau y_5 , g arabinan/100 g substrat), grupări acetil (GAc sau y_6 , g grupări acetil/100 g substrat), lignină Klason (LK sau y_7 , g lignină Klason/100 g substrat) (rezultate prezentate în tabelul 7.14).

Figura 7.17 prezintă evoluția în timp a concentrației de etanol corespunzătoare procesului SSF în regim semicontinuu.

Tabel 7.14. Condiții operaționale și rezultate experimentale privind zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C

Exp. nr.	Variabile independente		Variabile dependente		Variabile dependente experimentale*				
	RLS_F (g/g)	RCS_F (unități/g)	E_{MAX} (y_1)	CE (y_2)	Gn (y_3)	Xn (y_4)	Arn (y_5)	GAc (y_6)	LK (y_7)
1	5	10	46,19	83,70	44,80±0,37	4,14±0,10	0,15±0,00	0,45±0,01	41,81±0,38
2	4	10	51,56	77,10	41,19±0,39	4,01±0,10	0,09±0,01	0,48±0,03	44,01±0,34
3	3	10	14,61	17,22	43,22±0,41	4,09±0,08	0,02±0,00	0,19±0,00	41,00±1,60
4	5	5	39,94	72,37	44,14±0,49	4,09±0,09	0,11±0,00	0,43±0,00	43,90±0,45
5	4	5	25,26	37,77	42,52±0,69	3,96±0,06	0,01±0,00	0,43±0,01	39,45±0,28
6	3	5	25,51	30,06	42,98±0,07	3,88±0,02	0,07±0,00	0,37±0,00	43,92±0,17

τ_0 : solid = 50 %, enzime = 50 %, nutrienți = 50 %; τ_{39} : solid = 50 %, enzime = 50 % (doar pentru exp. 1; 2 și 3), nutrienți = 50 %; τ – timpul de reacție, ore.

* Datele sunt prezentate ca valori medii ± deviațiile standard pentru determinări realizate în duplicat.

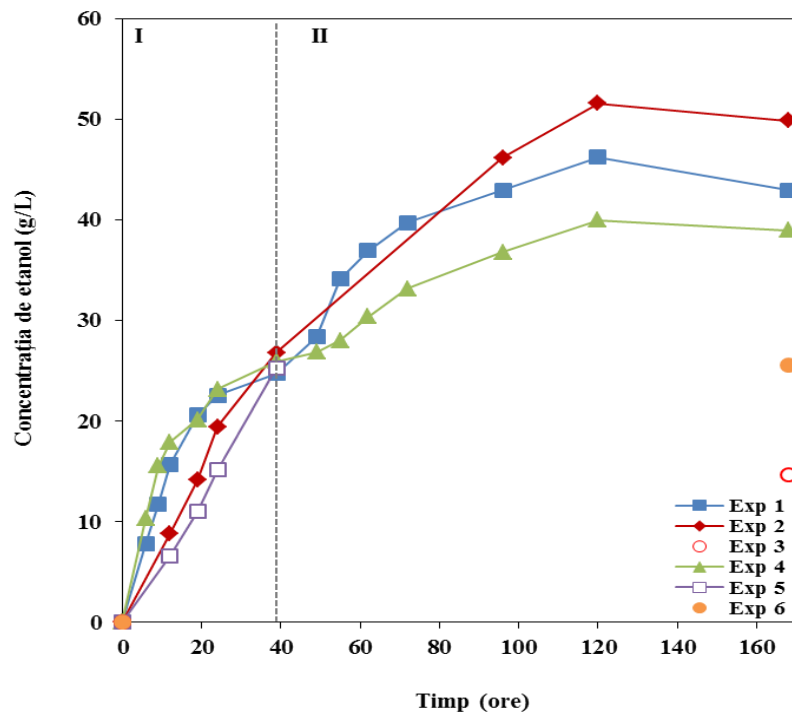


Figura 7.17. Evoluția în timp a concentrației de etanol corespunzătoare zaharificării și fermentării simultane în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C (Etapa I – τ_0 : solid = 50 %, enzime = 50 %, nutrienți = 50 %; Etapa II – τ_{39} : solid = 50 %, enzime = 50 % (doar pentru exp. 1; 2 și 3), nutrienți = 50 %; τ – timpul de reacție, ore)

Conform tabelului 7.14, în experimentul 1 (realizat la $RLS_F = 5$ g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat și $RCS_F = 10$ unități/g subst. uscată substrat) a fost obținută o concentrație maximă de etanol (E_{MAX}) de 46,19 g etanol/L (corespunzătoare unei conversii a celulozei în etanol de 83,7 %) iar în experimentul 2, realizat în condiții experimentale definite prin cantități mai ridicate de solide (cu $RLS_F = 4$ g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat și $RCS_F = 10$ unități/g subst. uscată substrat) a fost obținută o concentrație maximă de etanol (E_{MAX}) de 51,56 g etanol/L (corespunzătoare unei conversii de 77,1 %). Prin aceste rezultate experimentale s-a dovedit faptul că valorile obținute sunt mult mai mari decât cele considerate drept prag pentru rentabilitatea economică (30÷40 g etanol/L) (Wingren *et al.*, 2003).

7.4. Concluzii parțiale

- Autohidroliza realizată la temperatura de 210 °C (corespunzătoare unei severități de 4,20) a fost considerată condiția optimă pentru fracționarea eficientă a biomasei lignocelulozice de porumb, deoarece din punct de vedere al conceptului de "biorafinărie" reprezintă un compromis între recuperarea semnificativă de compuși derivați din hemiceluloză în faza lichidă (suma dintre xilo-oligomeri și xiloză a corespuns unui procent de 68 % din xilanul inițial) și obținerea unei faze solide adecvată din punct de vedere al compoziției și susceptibilității enzimaticice.
- Hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma pretratamentului prin autohidroliză, realizată în condiții experimentale definite prin $RLS = 15$ g lichid/g subst. uscată substrat și $RCS = 10$ unități/g subst. uscată substrat, a condus la conversii maxime a celulozei în glucoză de până la 92,8 %.
- Zaharificarea și fermentarea simultană a fazei solide rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C, realizată în regim discontinuu și în condiții experimentale definite prin cantități scăzute de solide ($RLS = 6÷9$ g lichid/g subst. uscată substrat) și concentrații ridicate de enzime ($RCS = 16$ unități/g subst. uscată substrat), a condus la concentrații moderate de etanol (37,75 g etanol/L) și la conversii ridicate a glucanului în etanol (86,05%).
- Zaharificarea și fermentarea simultană a fazei solide rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C, realizată în regim semicontinuu și în condiții experimentale definite prin cantități ridicate de solide ($RLS = 4÷5$ g lichid/g subst. uscată substrat) și concentrații scăzute de enzime ($RCS = 10$ unități/g subst. uscată substrat), a condus la concentrații ridicate de etanol (51,56 g etanol/L) și la conversii ridicate a glucanului în etanol (83,70%).

8. Obținerea bioetanolului prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a biomasei lignocelulozice de porumb autohidrolizată–delignificată

8.1. Introducere

Acest studiu prezintă optimizarea procesului de delignificare prin metoda organosolv (folosind biomasa lignocelulozică de porumb ca materie primă și o soluție de etanol-apă ca solvent) pentru obținerea bioetanolului prin intermediul procesului SSF în regim semicontinuu (engl. *fed-batch*). În experimentele desfășurate au fost analizate efectele temperaturii autohidrolizei, temperaturii delignificării și concentrației de etanol asupra variabilelor operaționale selectate. Procesul SSF în regim semicontinuu a fost realizat utilizând preparate enzimatiche comerciale (celulază suplimentată cu β -glucozidază) și drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CECT-1170, iar substratul, enzimele și nutrienții au fost adăugate în două etape: prima încărcare la începutul experimentelor (50 % din total) și a doua încărcare (50 % din total) după 48 ore de zaharificare și fermentare simultană.

8.2. Materiale și metode

8.2.4. Delignificarea fazei solide rezultată în urma pretratamentului

8.2.4.1. Delignificarea prin metoda organosolv în condiții izoterme

Delignificarea prin metoda organosolv a constat în tratamentul fazei solide rezultată în urma autohidrolizei, cu o soluție de etanol-apă, în vederea degradării ligninei și obținerii unui solid bogat în celuloză.

În vederea obținerii unor rezultate experimentale preliminare privind condițiile operaționale optime (temperatură și timpul delignificării) pentru fracționarea biomasei lignocelulozice de porumb pretrată hidrotermic, faza solidă rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C a fost supusă delignificării prin metoda organosolv, realizată într-un reactor sub presiune cu un volum intern de 450 mL (Parr 4842 model nr. 4563 M, Parr Instruments Company, Moline, Illinois, USA), folosind o soluție de etanol-apă și un raport lichid-solid (RLS) de 10 g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat, în condiții izoterme definite prin: temperatura delignificării (t_D) = 150 °C; 170 °C și 200 °C; timpul delignificării (τ_D) = 30 minute; 60 minute și 120 minute; concentrația de etanol (C) = 60 %.

Faza solidă rezultată în urma procesului organosolv a fost utilizată pentru determinarea randamentului delignificării, care reprezintă recuperarea fazei solide după delignificarea-

organosolv (R_D sau y_1 , g solid autohidrolizat-delignificat/100 g subst. uscată materie primă) și a fost supusă hidrolizei acide cantitative în vederea determinării diferitelor componente care reprezintă compoziția solidului autohidrolizat-delignificat: glucan (Gn sau y_2 , g glucan/100 g substrat), xilan (Xn sau y_3 , g xilan/100 g substrat), arabinan (Arn sau y_4 , g arabinan/100 g substrat), grupări acetil (GAc sau y_5 , g grupări acetil/100 g substrat) și lignină Klason (LK sau y_6 , g lignină Klason/100 g substrat) (rezultate prezentate în tabelul 8.5).

8.2.4.2. Delignificarea-organosolv cu trei variabile independente și trei nivele de variație

Faza solidă rezultată în urma autohidrolizei la temperaturi de 180 °C, 190 °C și 200 °C a fost supusă delignificării prin metoda organosolv, realizată într-un reactor sub presiune cu un volum intern de 450 mL (Parr 4842 model nr. 4563 M, Parr Instruments Company, Moline, Illinois, USA), folosind o soluție de etanol-apă și un raport lichid-solid (RLS) de 10 g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat, în condiții izoterme definite prin: temperatura autohidrolizei $t_A = 180$ °C, 190 °C și 200 °C; temperatura delignificării $t_D = 180$ °C, 190 °C și 200 °C; concentrația de etanol $C = 30\%$, 50% și 70% etanol; timp de 60 minute.

Biomasa lignocelulozică de porumb rezultată în urma delignificării prin metoda organosolv în condiții izoterme a fost filtrată prin hârtie de filtru, obținându-se două fracțiuni: faza lichidă (denumită "lichid negru") și faza solidă. Faza lichidă a fost filtrată prin membrane cu dimensiunea porilor de 0,45 μm și analizată direct prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) în vederea determinării concentrației de glucoză (cu valori de aprox. 0,01 g/L), xiloză (între 0,01÷0,28 g/L), arabinoză (între 0,01÷0,03 g/L), 5-hidroximetilfurfural (între 0,01÷0,03 g/L) și furfural (între 0,02÷0,45 g/L).

Faza solidă rezultată în urma delignificării a fost spălată cu o soluție de etanol-apă (încălzită la temperatura de 45 °C), în funcție de concentrațiile stabilite (30%, 50% și 70% etanol), în vederea precipitării ligninei, iar apoi cu apă distilată până la pH neutru și cântărită la balanța analitică în vederea determinării randamentului delignificării (R_D) (recuperarea fazei solide după delignificare) care a variat între 69 g solid autohidrolizat-delignificat/100 g subst. uscată materie primă (în experimentul 7 efectuat la $t_A = 180$ °C, $t_D = 180$ °C și $C = 30$ % etanol) și 84 g solid autohidrolizat-delignificat/100 g subst. uscată materie primă (în experimentul 2 efectuat la $t_A = 200$ °C, $t_D = 200$ °C și $C = 30$ % etanol).

O parte din faza solidă a fost uscată în aer, a fost supusă hidrolizei acide cantitative și analizată prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) în vederea determinării conținutului de poliglucide (glucan, xilan, arabinan) și grupări acetil. Reziduu solid rezultat în urma procesului de hidroliză acidă a fost cuantificat și considerat lignină Klason.

8.2.5. Hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma delignificării

Obiectivul acestui studiu a constat în obținerea unor concentrații ridicate de glucoză în urma hidrolizei enzimaticе, folosind fracționarea biomasei lignocelulozice de porumb prin etape secvențiale de pretratament prin autohidroliză (pentru a determina solubilizarea hemicelulozei) și delignificare prin metoda organosolv (pentru degradarea ligninei și obținerea unei faze solide bogată în celuloză).

Preparatele enzimaticе comerciale utilizate: celulaza "Celluclast 1.5 L" (din *Trichoderma reesei*) și β -glucozidaza "Novozym" (din *Aspergillus niger*) au fost achiziționate de la compania Novozymes (Madrid, Spania).

Hidroliza enzimatică a fost realizată în baloane Erlenmeyer de 100 mL, cu un volum util de 50 mL, plasate într-un termostat cu agitare orbitală (150 rpm), la temperatura de 48,5 °C, pH = 4,85, timp de 96 ore, în aceleași condiții pentru toate solidele autohidrolizate-delignificate (raport lichid-solid RLS = 15 g lichid/g subst. uscată substrat; raport celulază-substrat RCS = 10 unități/g subst. uscată substrat; raport β -glucozidază-substrat = 50 unități/g subst. uscată substrat), pentru a investiga efectele condițiilor operaționale față de evoluția în timp a concentrației de glucoză

Probele au fost prelevate la durate de timp prestabilite (între 0-96 ore), centrifugate la 6000 rpm, timp de 10 minute, filtrate prin membrane cu dimensiunea porilor de 0,45 μ m și analizate prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC), în vederea determinării concentrației maxime de glucoză (G_{MAX} sau y_7 , g/L) și a conversiei celulozei în glucoză (CCG sau y_8 , %) (rezultate prezentate în tabelul 8.5).

8.2.6. Zaharificarea și fermentarea simultană (SSF) în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma delignificării

Obiectivul acestui studiu a constat în obținerea bioetanolului din biomasa lignocelulozică de porumb pretrată prin etape secvențiale de autohidroliză și delignificare, prin intermediul procesului de zaharificare și fermentare simultană (SSF) în regim semicontinuu.

Preparatele enzimaticе comerciale utilizate: celulaza "Celluclast 1.5 L" (din *Trichoderma reesei*) și β -glucozidaza "Novozym" (din *Aspergillus niger*) au fost achiziționate de la compania Novozymes (Madrid, Spania).

Faza solidă rezultată în urma delignificării-organosolv la temperaturi de 180 °C; 190 °C și 200 °C a fost utilizată ca substrat pentru procesul SSF în regim semicontinuu, realizat în baloane Erlenmeyer de 250 mL cu un volum util de 100 mL, plasate într-un termostat cu

agitare orbitală (120 rpm), la temperatura de 35 °C (pH = 4,85), timp de 144 ore, în condiții operaționale finale corespunzătoare încărcării la 48 ore (raport lichid-solid RLS = 4 g lichid/g subst. uscată substrat; raport celulază-substrat RCS = 10 unități/g subst. uscată substrat; raport β -glucozidază-substrat = 50 unități/g subst. uscată substrat), folosind preparate enzimatiche comerciale (celulază suplimentată cu β -glucozidază), nutrienți = 10 mL și celule de drojdie = 10 mL (*Saccharomyces cerevisiae* CECT-1170, cu o concentrație de celule în mediul rezultat = 1,85 g/L).

Concentrația de nutrienți folosită în procesul SSF a fost următoarea: peptonă = 5 g/L; extract de drojdie = 3 g/L; extract de malț = 3 g/L; apă distilată = 1000 mL.

Substratul, enzimele și nutrienții au fost adăugate în două etape: prima încărcare a fost efectuată la începutul experimentelor (50 % din total), iar a doua încărcare după 48 ore de zaharificare și fermentare simultană (restul de 50 %). Probele au fost prelevate la durate de timp prestabilite (între 0÷144 ore) iar experimentele cu cele mai bune rezultate au fost analizate prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) pentru determinarea concentrației de etanol.

8.2.7. Determinarea compoziției chimice a fazei solide rezultată în urma procesului SSF

Faza solidă rezultată în urma procesului SSF în regim semicontinuu a fost uscată în aer, supusă hidrolizei acide cantitative și analizată prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) în vederea determinării conținutului de poliglucide (glucan, xilan, arabinan) și grupări acetil. Reziduul solid rezultat în urma procesului de hidroliză acidă a fost cuantificat și considerat lignină Klason.

8.2.8. Analiza statistică a datelor experimentale

Pentru analiza statistică a datelor experimentale a fost utilizat un software comercial (Microsoft Excel, Microsoft, Redmond, WA, USA). Optimizarea a fost realizată aplicând metoda analizei suprafeței de răspuns (RSM).

8.3. Rezultate și discuții

8.3.1. Studiul proceselor preliminare de autohidroliză, delignificare și hidroliză enzimatică a biomasei lignocelulozice de porumb

Pentru determinarea compatibilității dintre obținerea unor cantități mari de oligomeri în faza lichidă rezultată în urma autohidrolizei și un reziduu solid sensibil la hidroliza enzimatică a fost propus un proces format din două etape succesive: în prima etapă, biomasa

lignocelulozică de porumb a fost supusă procesului de autohidroliză în vederea obținerii unor cantități semnificative de oligomeri iar în a doua etapă, faza solidă rezultată în urma pretratamentului a fost supusă procesului de delignificare prin metoda organosolv.

În ceea ce privește etapa de autohidroliză, au fost selectate experimentele realizate în condiții non-izoterme, la temperaturi de 180 °C; 190 °C și 200 °C (corespunzătoare unor severități (S_0) de 3,39; 3,64 și 3,96). Scopul acestei etape de pretratament a fost solubilizarea hemicelulozei (în principal sub formă de oligomeri) precum și reținerea celulozei și ligninei în faza solidă, în vederea obținerii unei susceptibilități ridicate la tratamentele ulterioare (hidroliza enzimatică). Rezultatele au confirmat selectivitatea procesului de autohidroliză, deoarece mai mult de 90 % din glucanul și lignina prezente în materia primă au fost reținute în faza solidă, în timp ce hemiceluloza a fost solubilizată prin reducerea conținutului de xilan raportat la materia primă, prezentând valori de până la 5,5 g xilan/100 g subst. uscată materie primă (în experimentul efectuat la $S_0 = 3,96$).

Pe de altă parte, s-a demonstrat că xilo-oligomerii reprezintă principalele componente derivate din hemiceluloză și prezente în faza lichidă, în comparație cu alți compuși identificați în cantități mai mici (gluco-oligomeri, substituenți de oligomeri, monomeri și acid acetic). Conținutul de xilo-oligomeri obținut în experimentul efectuat la $S_0 = 3,96$ reprezintă 73 % din cantitatea inițială de xilan. Prin aceste rezultate s-a demonstrat faptul că domeniul de variație al severității pretratamentului este potrivit pentru maximizarea fracționării în această schemă tehnologică.

Experimentele preliminare de delignificare-organosolv au fost realizate folosind ca substrat faza solidă rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C ($S_0 = 4,20$), folosind diferite condiții operaționale: temperatura delignificării (t_D) în intervalul 150÷200 °C și timpul delignificării (τ_D) în intervalul 30÷120 minute.

Creșterea temperaturii delignificării (t_D) de la 150 °C la 200 °C (în experimentele 1, 2 și 4) a condus la obținerea unor solide cu un conținut ridicat în glucan și scăzut în lignină și mai ales cu o susceptibilitate mare la hidroliza enzimatică. Conversia celulozei în glucoză a crescut de la 65,84 % (în experimentul realizat la $t_D = 150$ °C și $\tau_D = 60$ minute) la 92,44 % (în experimentul efectuat la $t_D = 200$ °C și $\tau_D = 60$ minute) (rezultate prezentate în tabelul 8.5).

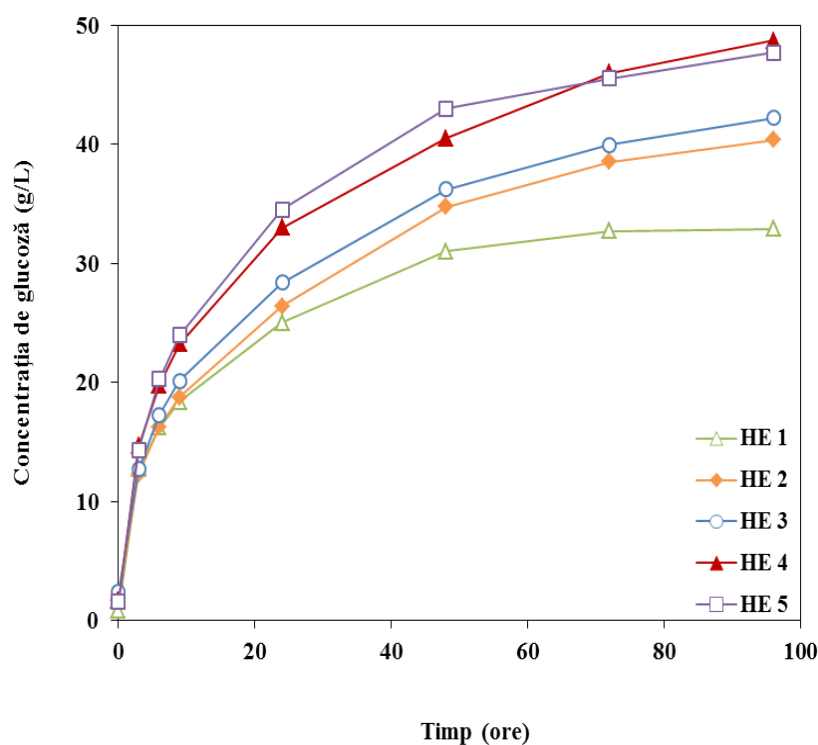
Pe de altă parte, prin variația timpului de delignificare (τ_D) de la 30 minute (în experimentul 3) la 120 minute (în experimentul 5) s-a obținut o fază solidă adecvată din punct de vedere al compoziției și susceptibilității enzimatice (în experimentul 4 realizat la $\tau_D = 60$ minute) (conform tabelului 8.5).

Tabel 8.5. Condiții operaționale și rezultate experimentale privind delignificarea-organosolv a fazei solide rezultată în urma autohidrolizei la temperatura de 210 °C și hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma delignificării-organosolv

Exp. nr.	Variabile independente delignificare-organosolv		Variabile dependente delignificare-organosolv						Variabile dependente hidroliza enzimatică	
	t_D (°C)	τ_D (min)	R_D (y_1)	Gn^* (y_2)	Xn^* (y_3)	Arn^* (y_4)	GAc^* (y_5)	LK^* (y_6)	G_{MAX} (y_7)	CCG (y_8)
1	150	60	75,83	70,94±0,75	5,64±0,09	0,08±0,00	0,43±0,03	15,61±0,29	32,92	65,84
2	170	60	78,87	70,09±0,37	5,05±0,04	0,05±0,00	0,31±0,02	17,38±0,54	40,38	81,65
3	200	30	80,60	72,84±0,33	4,31±0,08	0,01±0,00	0,22±0,02	15,83±0,24	42,21	82,21
4	200	60	78,00	74,88±0,50	3,95±0,05	0,01±0,00	0,20±0,01	14,09±0,06	48,74	92,44
5	200	120	77,60	74,41±1,28	3,06±0,13	0,01±0,00	0,24±0,02	17,11±1,75	47,71	90,89

* Datele sunt prezentate ca valori medii ± deviațiile standard pentru determinări realizate în triplicat.

Evoluția în timp a concentrației de glucoză corespunzătoare hidrolizei enzimaticice este prezentată în figura 8.2.

**Figura 8.2.** Evoluția în timp a concentrației de glucoză corespunzătoare hidrolizei enzimaticice a fazei solide rezultată în urma delignificării-organosolv

8.3.2. Studiul și optimizarea delignificării-organosolv a fazei solide rezultată în urma pretratamentului

Optimizarea procesului de delignificare-organosolv a fost realizată cu ajutorul metodei analizei suprafeței de răspuns (RSM) (Bruns *et al.*, 2005), utilizând un design factorial *Doehlert* (Doehlert, 1970; Doehlert & Klee, 1972; Massart *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2004; Araujo & Janagap, 2012) cu trei variabile independente și trei nivele de variație. Variabilele independente propuse au fost: temperatura autohidrolizei (t_A sau x_1), cu valori cuprinse între 180÷200 °C; temperatura delignificării (t_D sau x_2), cu valori cuprinse între 180÷200 °C; și concentrația de etanol (C sau x_3), cu valori cuprinse între 30÷70 g etanol/100 g soluție etanol-apă. Variabilele dependente experimentale au inclus: randamentul combinat (R_C sau y_1) care determină recuperarea solidului după procesul secvențial de autohidroliză și delignificare, precum și variabile care determină compoziția solidului autohidrolizat-delignificat (conținutul în glucan, xilan, arabinan, grupări acetil și lignină Klason) corespunzătoare variabilelor y_2 la y_6 . Variabilele dependente calculate de modelul empiric au fost: randamentul combinat calculat (R_{CCal} sau y_7) precum și valori teoretice calculate corespunzătoare variabilelor y_8 la y_{12} . Variabilele y_{13} la y_{17} au reprezentat recuperarea diferitelor fracțiuni (glucan, xilan, arabinan, grupări acetil și lignină Klason) după procesul de delignificare.

Corelația dintre variabilele independente și variabilele dependente a fost realizată prin intermediul unui design factorial cu o ecuație polinomială de gradul doi:

$$y_j = b_{0j} + \sum_i b_{ij} \cdot x_j + \sum_i \sum_k b_{ikj} \cdot x_j \cdot x_k$$

unde: y_j – variabila dependentă considerată ($j = 1 \div 6$); x_i sau x_k (i sau $k = 1 \div 3$, $k \geq i$) – variabile independente adimensionale; $b_{0j} \dots b_{ikj}$ – coeficienții de regresie, calculați din datele experimentale prin regresii multiple.

Tabelul 8.7 prezintă rezultatele experimentale obținute pentru condițiile operaționale selectate, iar tabelul 8.8 prezintă coeficienții de regresie ($b_{0j} \dots b_{ikj}$) și semnificația lor, precum și parametrii statistici care au măsurat corelația (R^2) și semnificația modelului (bazată pe parametrul Fisher).

Tabel 8.7. Condiții operaționale și rezultate experimentale privind delignificarea cu trei variabile independente și trei nivele de variație

Exp. nr.	Variabile independente dimensionale			Variabile independente adimensionale			Variabile dependente dimensionale						Variabile dependente calculate de modelul empiric						Recuperarea principalelor componente				
	t_A (°C)	t_D (°C)	C (%)	x_1	x_2	x_3	R_C (y_1)	Gn^* (y_2)	Xn^* (y_3)	Arn^* (y_4)	GAc^* (y_5)	LK^* (y_6)	R_{Ccal} (y_7)	Gn_{cal} (y_8)	Xn_{cal} (y_9)	Arn_{cal} (y_{10})	GAc_{cal} (y_{11})	LK_{cal} (y_{12})	$RecGn$ (y_{13})	$RecXn$ (y_{14})	$RecArn$ (y_{15})	$RecGAc$ (y_{16})	$RecLK$ (y_{17})
1	200	200	70	1	1	1	51,66	64,36±0,58	8,37±0,03	0,20±0,00	0,65±0,01	12,24±0,01	50,77	64,47	8,41	0,16	0,60	11,98	96,44	29,74	4,78	17,40	34,20
2	200	200	30	1	1	-1	54,25	64,23±0,66	2,88±0,02	0,10±0,00	0,25±0,00	19,83±0,13	54,88	64,64	2,45	0,16	0,27	20,52	100,00	10,74	2,51	7,03	58,18
3	200	180	70	1	-1	1	53,28	58,36±1,10	9,17±0,02	0,29±0,00	0,77±0,01	15,70±0,32	54,98	57,33	9,31	0,34	0,78	17,55	90,18	33,60	7,15	21,26	45,24
4	200	180	30	1	-1	-1	52,10	58,67±0,23	4,15±0,02	0,13±0,00	0,41±0,00	23,60±0,13	51,55	59,45	4,17	0,09	0,39	22,90	88,65	14,87	3,14	11,07	66,49
5	180	200	70	-1	1	1	56,99	57,14±0,87	12,38±0,11	0,32±0,00	0,57±0,01	12,17±0,21	57,67	56,26	12,33	0,35	0,60	13,06	94,44	48,52	8,44	16,83	37,51
6	180	180	70	-1	-1	1	62,23	48,46±0,57	15,55±0,30	0,85±0,01	1,05±0,01	15,65±0,07	61,74	47,95	15,95	0,79	1,03	15,15	87,46	66,55	24,49	33,85	52,67
7	180	180	30	-1	-1	-1	52,43	58,24±0,69	6,90±0,09	0,16±0,00	0,58±0,00	18,56±0,01	53,46	58,04	6,83	0,20	0,63	19,01	88,55	24,88	3,88	15,76	52,62
8	180	200	30	-1	1	-1	58,50	63,47±0,40	2,56±0,00	0,07±0,00	0,27±0,00	21,78±0,06	56,94	64,40	2,39	0,01	0,26	20,12	100,00	10,30	1,90	8,18	68,91
9	200	190	50	1	0	0	49,51	64,96±0,42	6,82±0,00	0,14±0,00	0,52±0,01	17,06±0,15	48,62	64,69	7,04	0,12	0,56	15,48	93,28	23,22	3,21	13,34	45,68
10	180	190	50	-1	0	0	52,68	59,23±0,61	10,43±0,03	0,22±0,00	0,72±0,01	13,25±0,18	53,02	59,88	10,33	0,27	0,68	14,08	90,50	37,79	5,37	19,65	37,75
11	190	200	50	0	1	0	51,11	65,21±0,55	7,56±0,08	0,10±0,00	0,39±0,00	11,12±0,04	52,26	64,63	8,17	0,11	0,40	11,47	96,66	26,57	2,37	10,33	30,74
12	190	180	50	0	-1	0	54,33	56,93±0,57	11,34±0,19	0,28±0,00	0,69±0,00	14,80±0,16	52,63	57,88	10,84	0,30	0,67	13,70	89,71	42,38	7,04	19,43	43,49
13	190	190	70	0	0	1	58,04	55,46±0,77	13,67±0,30	0,37±0,00	0,68±0,01	15,84±0,29	57,04	57,76	13,14	0,39	0,71	13,87	93,36	54,57	9,94	20,45	49,72
14	190	190	30	0	0	-1	54,52	64,82±0,37	4,95±0,02	0,09±0,00	0,38±0,01	18,85±0,03	54,96	62,89	5,60	0,10	0,34	20,07	100,00	18,56	2,27	10,73	55,58
15	190	190	50	0	0	0	52,57	62,13±0,55	10,29±0,10	0,24±0,00	0,59±0,00	12,73±0,23	52,01	62,40	9,91	0,19	0,55	13,40	94,72	37,20	5,84	16,07	36,19
16	190	190	50	0	0	0	51,71	63,13±0,01	9,94±0,12	0,21±0,00	0,56±0,01	13,17±0,21	52,01	62,40	9,91	0,19	0,55	13,40	94,68	35,35	5,03	15,00	36,83
17	190	190	50	0	0	0	50,62	62,68±0,43	9,74±0,08	0,18±0,00	0,50±0,01	12,81±0,06	52,01	62,40	9,91	0,19	0,55	13,40	92,02	33,91	4,22	13,11	35,07

* Datele sunt prezentate ca valori medii ± deviațiile standard pentru determinări realizate în duplicat.

Table 8.8. Coeficienții de regresie și parametrii statistici pentru corelația și semnificația modelului

Parametri	R_C	G_n	X_n	Arn	GAc	LK
	(y_1)	(y_2)	(y_3)	(y_4)	(y_5)	(y_6)
<i>Coeficienți de regresie</i>						
b_0	52,006***	62,398***	9,913***	0,191***	0,5548***	13,402***
b_1	-2,203***	2,404***	-1,643***	-0,076***	-0,059***	0,702***
b_2	-0,186	3,375***	-1,336***	-0,092***	-0,137***	-1,117*
b_3	1,041*	-2,565***	3,770***	0,148***	0,183***	-3,102***
b_{11}	-1,186	-0,116	-1,231***	0,0035	0,0616*	1,379
b_{22}	0,435	-1,141	-0,406	0,0014	-0,0184	-0,816
b_{33}	3,994***	-2,071*	0,546	0,0535	-0,0284	3,570***
b_{12}	-0,037	-0,294	0,680***	0,0625**	0,0638***	-0,871
b_{13}	-1,210*	1,991***	-0,995***	-0,0850***	-0,00125	-0,371
b_{23}	-1,886***	0,486	0,205	-0,0625**	-0,01625	-0,799
<i>Parametri statistici</i>						
R^2	0,901	0,953	0,991	0,951	0,972	0,909
F	7,1	15,7	84,6	15,1	27,2	7,80
<i>Nivel semnificativ</i>	>90%	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%

* Coeficient semnificativ pentru nivel de încredere de 90%; ** Coeficient semnificativ pentru nivel de încredere de 95%; *** Coeficient semnificativ pentru nivel de încredere de 99%; R^2 – corelația; F – parametrul Fisher.

Randamentul combinat al procesului secvențial de autohidroliză și delignificare (R_C sau y_1) a fost calculat prin înmulțirea randamentului autohidrolizei cu randamentul delignificării și a fost raportat la 100 g subst. uscată materie primă. Conform tabelului 8.7, acesta a prezentat valori cuprinse între 49,51 g solid autohidrolizat-delignificat/100 g subst. uscată materie primă (în experimentul 9 efectuat la $t_A = 200$ °C, $t_D = 190$ °C și $C = 50$ % etanol) și 62,23 g solid autohidrolizat-delignificat/100 g subst. uscată materie primă (în experimentul 6 efectuat la $t_A = 180$ °C, $t_D = 180$ °C și $C = 70$ % etanol). În conformitate cu coeficienții din tabelul 8.8, temperatura autohidrolizei și concentrația de etanol au fost cele mai influente variabile independente.

Figura 8.3 prezintă suprafața de răspuns pentru dependența randamentului combinat (R_C) față de temperatura delignificării (t_D) și temperatura autohidrolizei (t_A), la o valoare intermediară a concentrației de etanol (C) de 50 %, observându-se o dependență mare a randamentului combinat față de temperatura autohidrolizei.

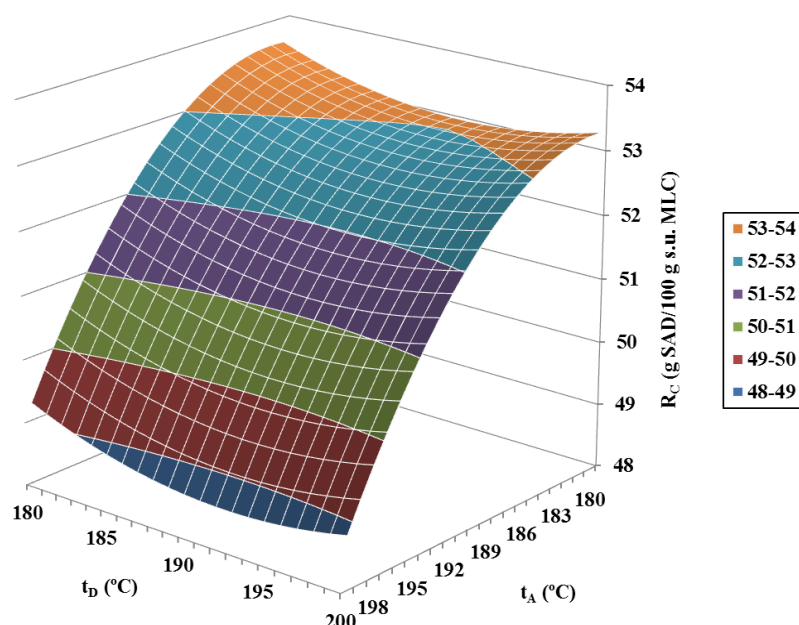


Figura 8.3. Suprafața de răspuns pentru dependența randamentului combinat (R_C , g solid autohidrolizat-delignificat (SAD)/100 g subst. uscată material lignocelulozic (MLC) față de temperatura autohidrolizei (t_A , °C) și temperatura delignificării (t_D , °C), pentru experimentele efectuate la concentrația de etanol (C , g etanol/ 100 g soluție etanol-apă) de 50 %

Conform rezultatelor prezentate în tabelul 8.7, conținutul de glucan al solidului autohidrolizat-delignificat (Gn sau y_2) a variat de la concentrații de 48,46 g glucan/100 g subst. uscată solid autohidrolizat-delignificat (în experimentul 6 efectuat la $t_A = 180$ °C, $t_D = 180$ °C și $C = 70$ % etanol) până la valori de 65,21 g glucan/100 g subst. uscată solid autohidrolizat-delignificat (în experimentul 11 efectuat la $t_A = 190$ °C, $t_D = 200$ °C și $C = 50$ % etanol). Conform datelor din tabelul 8.8, s-a observat că toate cele trei variabile (t_A , t_D și C) au fost influente (cu temperatura autohidrolizei într-o măsură mai mică), iar conținutul de glucan a atins valori maxime odată cu creșterea celor trei variabile independente.

Considerând solidul autohidrolizat-delignificat (SAD) ca substrat pentru producerea bioetanolului de a doua generație, s-a demonstrat că rezultatele obținute în această etapă au prezentat valori ridicate ale conținutului de glucan în vederea obținerii unor concentrații ridicate de bioetanol.

Figura 8.4 prezintă suprafața de răspuns pentru dependența conținutului de glucan (Gn) față de temperatura delignificării (t_D) și concentrația de etanol (C), la temperatura autohidrolizei (t_A) de 200 °C.

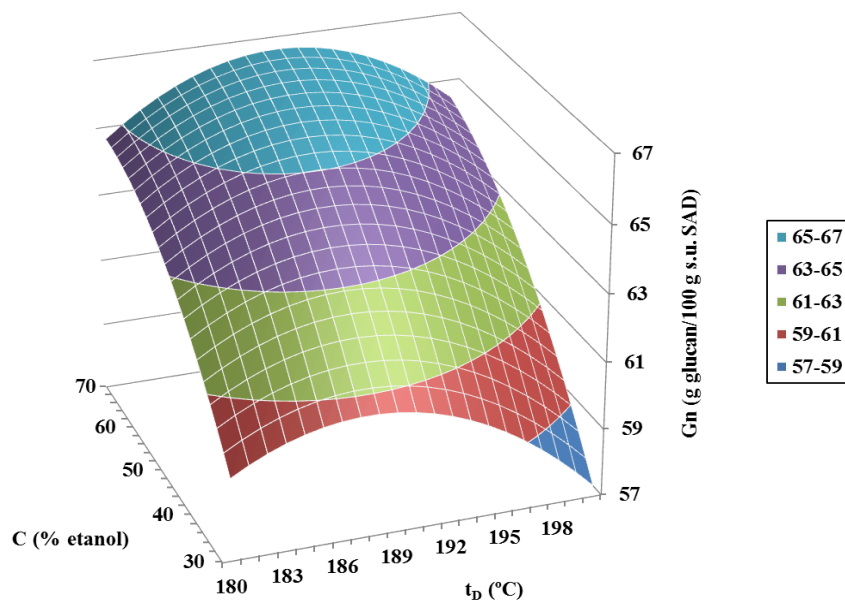


Figura 8.4. Suprafața de răspuns pentru dependența conținutului de glucan (G_n , g glucan/100 g subst. uscată solid autohidrolizat-delignificat (SAD) față de concentrația de etanol (C , g etanol/100 g soluție etanol-apă) și temperatura delignificării (t_D , °C), pentru experimentele efectuate la temperatura autohidrolizei (t_A , °C) de 200 °C

În urma analizei s-a demonstrat că solidul autohidrolizat-delignificat a prezentat cantități reduse ale conținutului de xilan (X_n sau y_3), cu valori minime de până la 2,56 g xilan/100 g subst. uscată solid autohidrolizat-delignificat (în experimentul 8 efectuat la $t_A = 180$ °C, $t_D = 200$ °C și $C = 30$ % etanol).

Conform datelor din tabelul 8.8, concentrația de etanol a fost cea mai influentă variabilă, în timp ce temperatura autohidrolizei și temperatura delignificării au prezentat o influență similară și respectiv mai mică. Conținutul de xilan s-a redus odată cu reducerea valorilor concentrației de etanol și creșterea temperaturii autohidrolizei.

Figura 8.5 prezintă suprafața de răspuns pentru dependența conținutului de xilan (X_n) față de temperatura autohidrolizei (t_A) și concentrația de etanol (C), la temperatura delignificării (t_D) de 200 °C.

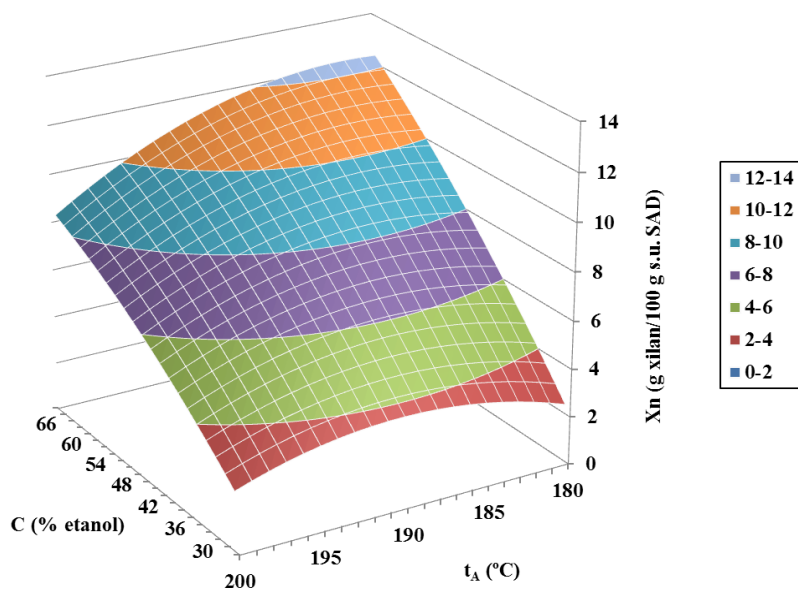


Figura 8.5. Suprafața de răspuns pentru dependența conținutului de xilan (X_n , g glucan/100 g subst. uscată solid autohidrolizat-delignificat (SAD) față de concentrația de etanol (C , g etanol/100 g soluție etanol-apă) și temperatura autohidrolizei (t_A , °C), pentru experimentele efectuate la temperatura delignificării (t_D , °C) de 200 °C

Conținutul de lignină Klason a solidului autohidrolizat-delignificat (LK sau y_6) a variat între 11,12 g lignină Klason/100 g subst. uscată solid autohidrolizat-delignificat (în experimentul 11 efectuat la $t_A = 190$ °C, $t_D = 200$ °C și $C = 50$ % etanol) și 23,60 g lignină Klason/100 g subst. uscată solid autohidrolizat-delignificat (în experimentul 4 efectuat la $t_A = 200$ °C, $t_D = 180$ °C și $C = 30$ % etanol). Conform datelor din tabelul 8.8, concentrația de etanol a fost cea mai influentă variabilă iar conținutul de lignină Klason a scăzut odată cu creșterea concentrației de etanol.

Figura 8.6 prezintă suprafața de răspuns pentru dependența conținutului de lignină Klason (LK) față de temperatura autohidrolizei (t_A) și concentrația de etanol (C), la temperatura delignificării (t_D) de 200 °C.

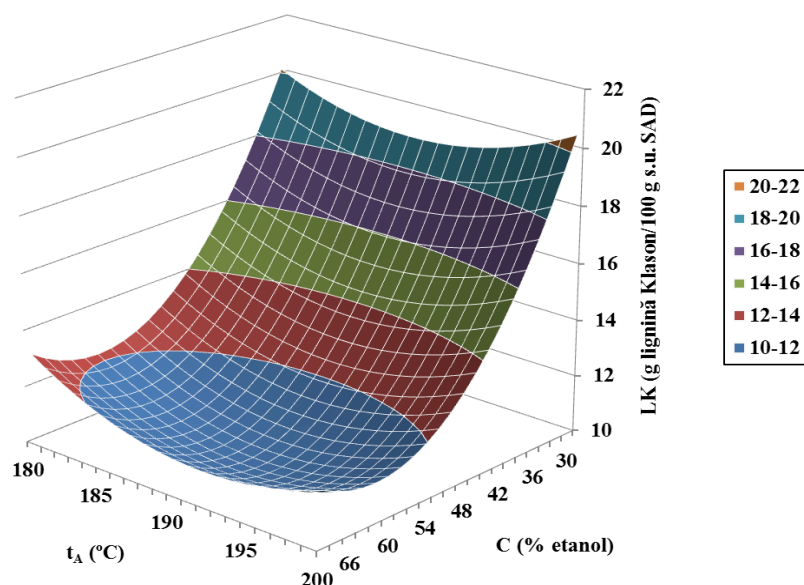


Figura 8.6. Suprafața de răspuns pentru dependența conținutului de lignină Klason (LK , g lignină Klason/ 100 g subst. uscată solid autohidrolizat-delignificat (SAD) față de concentrația de etanol (C , g etanol/ 100 g soluție etanol-apă) și temperatura autohidrolizei (t_A , °C), pentru experimentele efectuate la temperatura delignificării (t_D , °C) de 200 °C

8.3.3. Recuperarea principalelor componente din faza solidă rezultată în urma delignificării

În funcție de compoziția materiei prime și de rezultatele fracționării (randamentul combinat și compoziția solidului autohidrolizat-delignificat), s-a calculat recuperarea diferitelor componente (glucan, xilan, arabinan, grupări acetil și lignină Klason) din faza solidă autohidrolizată-delignificată.

Conform rezultatelor prezentate în tabelul 8.7, recuperarea glucanului ($RecGn$) a fost realizată în proporție de 94 % (valoare medie), rezultat care confirmă faptul că glucanul a fost reținut practic în totalitate în faza solidă, acesta fiind și unul dintre obiectivele prezentului studiu. Variabilele $RecXn$, $RecArn$ și $RecGAc$ (corespunzătoare componentelor hemicelulozice), au arătat un comportament similar, cu valori minime de $RecXn = 10,30$ % (în experimentul 8), $RecArn = 1,90$ % (în experimentul 8) și $RecGAc = 7,03$ % (în experimentul 2), demonstrând că fracțiunea hemicelulozică a fost aproape complet solubilizată. Recuperarea ligninei Klason ($RecLK$) din solidul autohidrolizat-delignificat a prezentat o valoare minimă de 30,74 % (în experimentul 11) și o valoare medie de 46,29 %.

Gradul de fracționare a componentelor structurale din biomasa lignocelulozică de porumb (unul dintre cele mai importante obiective ale acestui studiu) a fost definit ca fiind suma dintre glucanul rămas în faza solidă autohidrolizată-delignificată și hemiceluloza și lignina solubilizate în timpul tratamentelor secvențiale de autohidroliză și delignificare, referindu-se la conținutul acestor componente în materia primă. Acest parametru a prezentat o valoare medie de 77,8 %, fiind cuprins în intervalul de 65,2 % (în experimentul 6 efectuat în condiții mai puțin severe: $t_A = 180$ °C, $t_D = 180$ °C și $C = 70$ % etanol) până la 84,7 % (în experimentul 11 efectuat în condiții severe: $t_A = 190$ °C, $t_D = 200$ °C și $C = 50$ % etanol).

Recuperarea ridicată de celuloză din solidele procesate împreună cu eliminarea hemicelulozei și ligninei din faza solidă, precum și obținerea unor valori ridicate în ceea ce privește fracționarea componentelor structurale, a confirmat compatibilitatea modelului experimental considerat în acest studiu pentru fracționarea eficientă a biomasei lignocelulozice de porumb.

8.3.4. Obținerea bioetanolului prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma delignificării

În vederea completării studiului de obținere a bioetanolului din biomasa lignocelulozică de porumb, solidul autohidrolizat-delignificat rezultat în urma procesului organosolv a fost supus zaharificării și fermentării simultane (SSF) în regim semicontinuu. Substratul, enzimele și nutrienții au fost adăugate în două etape: 50 % la începutul procesului, iar restul de 50 % după 48 ore de zaharificare și fermentare simultană. Pentru a obține concentrații ridicate de bioetanol, a fost selectată o valoare finală a raportului lichid-solid RLS_F de 4 g lichid/g subst. uscată solid autohidrolizat-delignificat și o valoare intermediară a raportului celuloză-substrat RCS_F de 10 unități/g, valori corespunzătoare încărcării la 48 ore.

Figura 8.7 prezintă evoluția în timp a concentrației de etanol corespunzătoare procesului SSF în regim semicontinuu, iar tabelul 8.10 prezintă condițiile operaționale utilizate în procesul secvențial de autohidroliză-delignificare, experimentele cu cele mai bune rezultate obținute în procesul SSF pentru concentrația maximă de etanol (E_{MAX} sau y_1 , g etanol/L) și conversia maximă a glucanului în etanol (CE sau y_2 , g etanol/100 g etanol potențial), precum și principalii compuși recuperați din faza solidă rezultată în urma procesului SSF: glucan (Gn sau y_3 , g glucan/100 g substrat), xilan (Xn sau y_4 , g xilan/100 g substrat), arabinan (Arn sau y_5 , g arabinan/100 g substrat), grupări acetil (GAc sau y_6 , g grupări acetil/100 g substrat), lignină Klason (LK sau y_7 , g lignină Klason/100 g substrat).

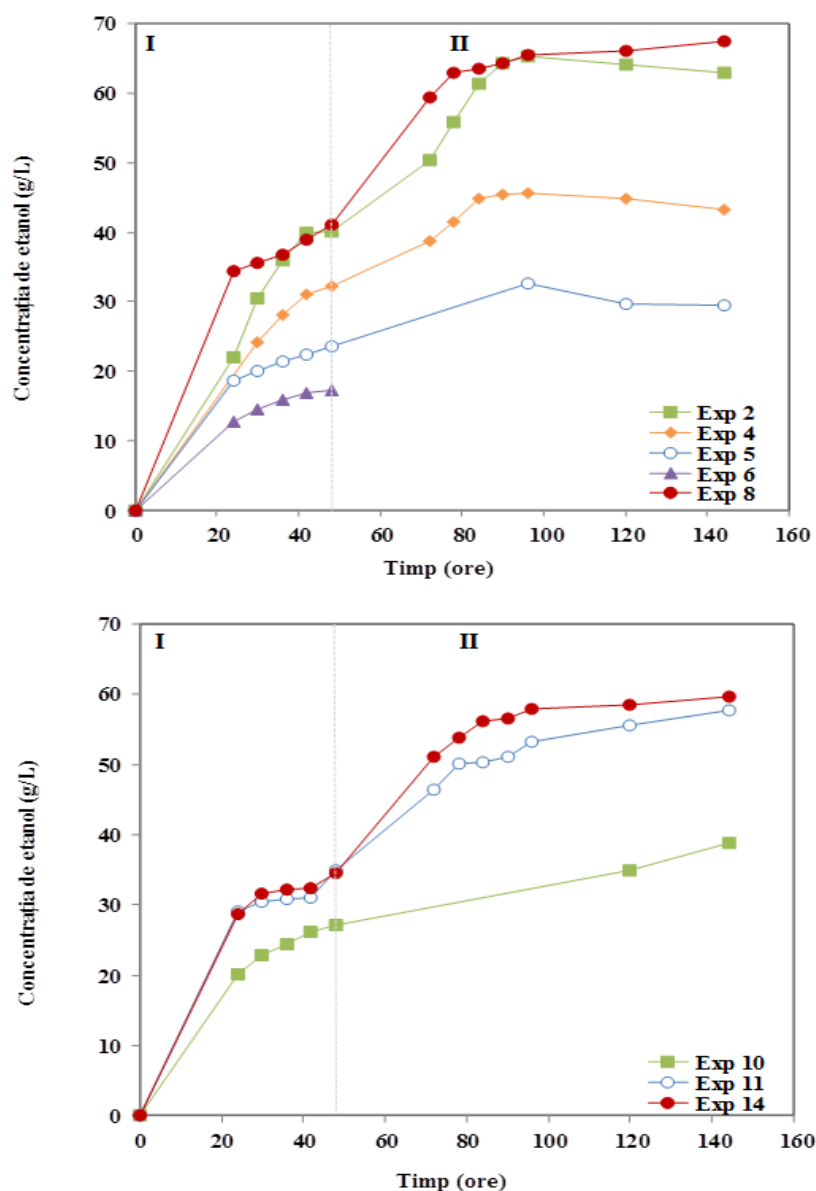


Figura 8.7. Evoluția în timp a concentrației de etanol corespunzătoare zaharificării și fermentării simultane în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma delignificării-organosolv (Etapa I – τ_0 : solid = 50 %, enzime = 50 %; Etapa II – τ_{48} : solid = 50 %, enzime = 50 %; τ – timpul de reacție, ore)

Cele mai bune rezultate au fost obținute în procesul SSF care folosește ca substrat solidul autohidrolizat-delignificat recuperat de la experimentul 2 (efectuat la $t_A = 200$ °C, $t_D = 200$ °C și $C = 30$ % etanol), în urma căruia s-a obținut o concentrație maximă de etanol $E_{MAX} = 65,40$ g etanol/L (corespunzătoare unei conversii maxime a glucanului în etanol $CE = 85,66$ %), precum și în procesul SSF care folosește ca substrat solidul obținut în condițiile experimentului 8 (efectuat la $t_A = 180$ °C, $t_D = 200$ °C și $C = 30$ % etanol), cu o concentrație maximă de etanol $E_{MAX} = 67,46$ g etanol/L (corespunzătoare unei conversii maxime a glucanului în etanol $CE = 89,06$ %) (rezultate prezentate în tabelul 8.10)..

Table 8.10. Condiții operaționale și rezultate experimentale privind zaharificarea și fermentarea simultană în regim semicontinuu a fazei solide rezultată în urma delignificării-organosolv

Exp. nr.	Variabile independente autohidroliză- delignificare			Variabile dependente Fed-Batch SSF		Variabile dependente experimentale Fed-Batch SSF*				
	t_A (°C)	t_D (°C)	C (%)	E_{MAX} (y_1)	CE (y_2)	Gn (y_3)	Xn (y_4)	Arn (y_5)	GAc (y_6)	LK (y_7)
2	200	200	30	65,40	85,66	17,45±0,00	1,91±0,00	0,04±0,00	0,28±0,00	69,87±0,00
4	200	180	30	45,63	64,91	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
5	180	200	70	32,55	48,69	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
6	180	180	70	17,22	30,16	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
8	180	200	30	67,46	89,06	19,31±0,23	1,42±0,02	0,05±0,00	0,39±0,01	66,82±0,52
10	180	190	50	38,78	55,84	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
11	190	200	50	57,78	75,89	41,09±0,11	5,51±0,01	0,05±0,00	0,47±0,00	34,77±0,88
14	190	190	30	59,61	77,53	22,94±0,32	2,80±0,00	0,04±0,00	0,50±0,00	58,15±1,35

τ_0 : solid = 50 %, enzime = 50 %; τ_{48} : solid = 50 %, enzime = 50 %; τ – timpul de reacție, ore; n.d – nederminat.

* Datele sunt prezentate ca valori medii ± deviațiile standard pentru determinări realizate în duplicat.

Pentru a concluziona, se poate remarca faptul că în acest studiu s-au obținut rezultate foarte bune în majoritatea experimentelor SSF efectuate în regim semicontinuu, cu valori mai mari decât cele considerate drept prag pentru rentabilitatea economică (30÷40 g etanol/L) (Wingren *et al.*, 2003).

8.4. Concluzii parțiale

- Rezultatele obținute în urma procesului organosolv (cu soluție etanol-apă de 60 %) au demonstrat faptul că delignificarea realizată la temperatura de 200 °C, timp de 60 minute, în condiții izoterme, reprezintă un tratament adecvat pentru obținerea unui substrat bogat în celuloză.
- Fraționarea biomasei lignocelulozice de porumb prin etape secvențiale de autohidroliză non-izotermă și delignificare-organosolv a condus la o conversie maximă a hemicelulozei în monomeri și oligomeri, precum și la reziduuri solide cu un conținut ridicat de glucan (65,21 g/100 g subst. uscată substrat) și scăzut de lignină (11,12 g/100 g subst. uscată substrat).
- Utilizarea în hidroliza enzimatică a biomasei lignocelulozice de porumb pretrată prin etape secvențiale de autohidroliză și delignificare, în condiții experimentale definite prin cantități scăzute de solide (RLS = 15 g lichid/g subst. uscată substrat) și

concentrații moderate de enzime (RCS = 10 unități/g subst. uscată substrat), a condus la obținerea unor concentrații ridicate de glucoză (48,74 g glucoză/L) precum și a unor conversii ridicate a celulozei în glucoză (92,44 %).

- Zaharificarea și fermentarea simultană a fazei solide rezultată în urma procesului de delignificarea-organosolv, efectuată în regim semicontinuu și în condiții experimentale definite prin cantități ridicate de solide (RLS = 4 g lichid/g subst. uscată substrat) și concentrații moderate de enzime (RCS = 10 unități/g subst. uscată substrat), a condus la concentrații ridicate de etanol (67,46 g etanol/L) precum și la conversii ridicate a celulozei în etanol (89,06 %).

Referințe bibliografice selective

- Araujo, A., Janagap, S., 2012. Doehlert uniform shell designs and chromatography. *Journal of Chromatography B*, 910, 14–21.
- Bruns, R.E., Scarminio, I.S., De Barros Neto, B., 2005. Statistical design – Chemometrics. *Data Handling in Science and Technology*, 25, 1–412.
- Doehlert, D.H., 1970. Uniform shell designs. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied statistics)*, 19, 231–239.
- Doehlert, D.H., Klee, V.L., 1972. Experimental designs through level reduction of the d-dimensional cuboctahedron. *Discrete Mathematics*, 2, 309–334.
- Ferreira, S.L.C., dos Santos, W.N.L., Quintella, C.M., Neto, B.B., Bosque-Sendra, J.M., 2004. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry – review. *Talanta*, 63, 1061–1067.
- Holtzapple, M.T., Caram, H.S., Humphrey, A.E., 1984. A comparison of two empirical models for the enzymatic hydrolysis of pretreated poplar wood. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 936–941.
- Lavoie, J.M., Capek-Menard, E., Gauvin, H., Chornet, E., 2010. Production of pulp from *Salix viminalis* energy crops using the FIRSST process. *Bioresource Technology*, 101, 4940–4946.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.C.M., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J., 1998. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. *Data Handling in Science and Technology*, 20, 1–867.
- Milne, T.A., Brennan, A.H., Glenn, B.H. 1990. Sourcebook of methods of analysis for biomass and biomass-conversion processes, Elsevier Science Publishers Ltd. 1–341.
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., 2003. Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. *Biotechnology Progress*, 19, 1109–1117.
- Wyman, C.E., 1996. Handbook on bioethanol: production and utilization. Applied Energy Technology Series, Taylor & Francis. 1–424.

9. Concluzii generale

- Autohidroliza non-izotermă a biomasei lignocelulozice de porumb urmată de zaharificarea și fermentarea simultană a fazei solide pretratată hidrotermic a reprezentat o schemă tehnologică adecvată pentru producția bioetanolului ca sursă alternativă de biocombustibili.
- S-a demonstrat că prin intermediul pretratementului realizat la severitatea de 4,20 se pot obține cantități de 12,6 g glucide solubile/100 g subst. uscată materie primă, precum și o fază solidă cu susceptibilitate ridicată la prelucrarea enzimatică.
- Producția de bioetanol prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim discontinuu a fost optimizată cu ajutorul metodei analizei suprafeței de răspuns, identificându-se condițiile de exploatare care au condus la obținerea unor concentrații ridicate de bioetanol (37,75 g etanol/L).
- Utilizarea procesului de zaharificare și fermentare simultană în regim semicontinuu, în condiții experimentale definite prin cantități ridicate de solide, a permis îmbunătățirea concentrației de bioetanol, obținându-se valori maxime de până la 51,56 g etanol/L.
- Procesul continuu de autohidroliză non-izotermă, delignificare-organosolv a fazei solide rezultată în urma pretratementului, precum și zaharificarea și fermentarea simultană a fazei solide autohidrolizată-delignificată, reprezintă o schemă tehnologică potrivită pentru fracționarea biomasei lignocelulozice de porumb și obținerea bioetanolului de a doua generație.
- Procesarea biomasei lignocelulozice de porumb prin delignificare-organosolv a fost optimizată cu ajutorul metodei analizei suprafeței de răspuns, obținându-se solide bogate în celuloză și un grad ridicat de fracționare.
- În urma zaharificării și fermentării simultane în regim semicontinuu a fazei solide autohidrolizată-delignificată au fost obținute concentrații maxime de bioetanol de 65÷67,5 g etanol/L, precum și conversii maxime a celulozei în etanol de până la 86÷89%, valori superioare celor necesare pentru fezabilitatea tehnico-economică a procesului global.

10. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective

Cercetările efectuate în cadrul programului de studii doctorale au adus o serie de contribuții originale care sporesc valoarea științifică și aplicativă a tezei de doctorat, după cum urmează:

- S-a analizat compoziția chimică a biomasei lignocelulozice de porumb (tulpini și frunze de porumb) prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC), în vederea cuantificării compușilor esențiali, necesari pentru procesele ulterioare.
- S-a studiat fracționarea biomasei lignocelulozice de porumb prin intermediul procesului de autohidroliză în condiții non-izoterme, în reactor sub presiune, în vederea obținerii unor cantități importante de compuși valoroși derivați din hemiceluloză (în principal xilo-oligomeri).
- S-a studiat delignificarea biomasei lignocelulozice de porumb prin intermediul procesului organosolv în condiții izoterme, în reactor sub presiune, în vederea obținerii unui substrat solid bogat în celuloză și susceptibil la hidroliza enzimatică.
- S-a optimizat procesul de delignificare a biomasei lignocelulozice de porumb, prin intermediul metodei analizei suprafeței de răspuns (RSM), în vederea analizării efectelor condițiilor specifice de procesare asupra variabilelor operaționale selectate.
- S-au obținut concentrații ridicate de glucoză prin hidroliza enzimatică a fazei solide rezultată în urma pretratamentului și delignificării-organosolv.
- S-au obținut concentrații ridicate de bioetanol prin zaharificarea și fermentarea simultană în regim discontinuu și semicontinuu a fazei solide rezultată în urma proceselor de autohidroliză și delignificare.
- S-a optimizat procesul de zaharificare și fermentare simultană, prin intermediul metodei analizei suprafeței de răspuns (RSM), în vederea confirmării rezultatelor experimentale.

În perspectiva cercetărilor viitoare se propune microîncapsularea celulelor de drojdie pentru eliberarea treptată și prelungită în procesul de fermentare, precum și realizarea procesului de zaharificare și fermentare simultană cu două microorganisme în același timp: *Saccharomyces cerevisiae* (pentru fermentarea glucozei) și *Pichia stipitis* (pentru fermentarea xilozei), în vederea creșterii randamentului de bioetanol și obținerii unei surse alternative de combustibili.

11. Diseminarea rezultatelor cercetării

Diseminarea rezultatelor cercetării s-a materializat prin publicarea a 4 lucrări științifice, dintre care 2 articole în curs de publicare în reviste cotate ISI și 2 articole publicate într-o revistă indexată în baze de date internaționale, precum și prin participarea la 4 manifestări științifice internaționale:

A. Articole științifice în curs de publicare în reviste cotate ISI

1. **Cristian-Teodor Buruiana**, Camelia Vizireanu, Gil Garrote, Juan Carlos Parajó, 2013. Second generation bioethanol from hydrothermally pretreated corn stover by Simultaneous Saccharification and Fermentation: operation in batch and fed–batch modes. *Industrial & Engineering Chemistry Research (ACS Publications)*, factor de impact în 2012: 2,206 (în recenzie).

2. **Cristian-Teodor Buruiana**, Camelia Vizireanu, Gil Garrote, Juan Carlos Parajó, 2013. Bioethanol production from autohydrolyzed–delignified corn stover by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Energy & Fuels (ACS Publications)*, factor de impact în 2012: 2,853 (în recenzie).

B. Articole științifice publicate în revistă indexată în baze de date internaționale

1. **Cristian-Teodor Buruiana**, Gil Garrote and Camelia Vizireanu, 2013. Bioethanol production from residual lignocellulosic materials: A review – Part 1. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*. 37(1), 9–24.

2. **Cristian-Teodor Buruiana**, Gil Garrote and Camelia Vizireanu, 2013. Bioethanol production from residual lignocellulosic materials: A review – Part 2. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*. 37(1), 25–38.

C. Lucrări științifice comunicate la manifestări internaționale

1. **Cristian-Teodor Buruiana**, Camelia Vizireanu, Gil Garrote and Juan Carlos Parajó. Second generation bioethanol from corn stover. *ANQUE International Congress of Chemical Engineering 'Innovating for the future'*, 24th–27th June 2012, Sevilla, Spain.
2. **Cristian-Teodor Buruiana**, Gil Garrote and Camelia Vizireanu. Bioethanol production from corn stover. *The Second PhD Student Symposium*, 13th–14th December 2012, Galati, Romania.
3. **Cristian-Teodor Buruiana**, Gil Garrote, Juan Carlos Parajó and Camelia Vizireanu. Bioethanol production from autohydrolyzed corn stover by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *International Conference of Applied Sciences, Chemistry and Chemical Engineering – Seventh Edition*, 15th–18th May 2013, Bacau, Romania.
4. **Cristian-Teodor Buruiana**, Gil Garrote, Juan Carlos Parajó, Camelia Vizireanu. Experimental assessment on the enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed–delignified corn stover. *The 4th International Conference on Food Chemistry, Engineering & Technology*, 30th–31th May 2013, Timisoara, Romania.