

ROMÂNIA
MINISTERUL EDUCAȚIEI, CERCETĂRII, TINERETULUI ȘI SPORTULUI
UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS DIN GALAȚI

Strada Domnească nr. 47, cod poștal 800008
Galați, România
E-mail: rectorat@ugal.ro



Tel.: (+4) 0336-130.109; 0336-130.108; 336-130.104
Fax: (+4) 0236 - 461.353
www.ugal.ro

c5909/22.06.2011

Către

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați vă face cunoscut că în data de _____, ora _____, în sala _____, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: "Biovalorificarea celulozei din hârtie reziduală prin utilizarea enzimelor și a culturilor starter fungice", elaborată de domnul/doamna ing. ANDONE IULIANA(LEUȘTEAN), în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Inginerie industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

Presedinte:

Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE
Decan – Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

**Conducător
de doctorat:**

Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Referent 1:

Prof.univ.dr. Valentin I. POPA
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași

Referent 2:

Prof.univ.dr. Stefana JURCOANE
Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București

Referent 3:

Conf.univ.dr.ing. Luminița GEORGESCU
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.

Prof.dr.ing.

SECRETAR DOCTORAT,

Ing. Luiza AXINTE

UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” GALAȚI
FACULTATEA
”ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR”

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

BIOVALORIFICAREA CELULOZEI DIN HÂRTIE
REZIDUALĂ PRIN UTILIZAREA ENZIMELOR ȘI A
CULTURILOR STARTER FUNGICE

Coordonator științific
prof. dr. ing. BAHRIM GABRIELA

Doctorand
ing. ANDONE (LEUȘTEAN) IULIANA

GALAȚI
2011

CUPRINS

I. INTRODUCERE	8
II. STUDIU DOCUMENTAR	14
1. Stadiul actual al cercetărilor privind biovalorificarea celulozei	15
1.1. Celuloza, caracteristici fizico-chimice și biochimice.....	15
1.2. Posibilități de biovalorificare a celulozei din deșeuri.....	19
2. Procese microbiologice și biochimice cu implicații în bioconversia celulozei	
2.1. Potențialul microorganismelor de a biotransforma celuloza.....	23
2.1.1. Particularități morfo-fiziologice ale mucegaiurilor, activ producătoare de celulaze.....	24
2.1.2. Creșterea și multiplicarea mucegaiurilor în diferite sisteme de cultivare.....	28
2.1.3. Sisteme de cultivare a culturilor fungice	32
2.2. Utilizarea preparatelor enzimatiche comerciale în biotransformarea celulozei din deșeuri.....	34
2.3. Cinetica reacțiilor de hidroliză enzimatică a celulozei.....	38
3. Procedee biotehnologice de valorificare a deșeurilor celulozice	46
3.1. Pretratamente aplicate materialelor celulozice.....	46
3.1.1. Tratamente fizico-chimice.....	47
3.1.2. Tratamente biologice.....	52
3.2. Hidroliza materialelor celulozice.....	53
3.3. Biovalorificarea superioară a deșeurilor celulozice.....	58
3.3.1. Bioproducerea de etanol.....	58
3.3.2. Bioconversia în biomasă proteică (SCP).....	62
III. REZULTATE EXPERIMENTALE	66
4. Studii preliminare privind biotransformarea deșeurilor lignocelulozice	67
4.1. Oportunitatea studiului.....	67
4.2. Materiale și metode de analiză.....	68
4.2.1. Materiale.....	68
4.2.2. Metode de analiză.....	69
4.2.3. Infrastructura de cercetare.....	74
4.3. Rezultate și discuții.....	75
4.3.1. Analiza eficienței unor pretratamente în modificarea recalcitranței unor substraturi lignocelulozice.....	75
4.3.2. Studiul hidrolizei enzimatiche a substraturilor celulozice pretratate.....	83
4.3.3. Studiul cineticii procesului de hidroliză enzimatică a substraturilor celulozice	85
4.3.4. Dinamica procesului de hidroliză enzimatică a substraturilor celulozice.....	99

4.3.5. Analiza procesului de hidroliză enzimatică a substratului celulozic mixt, în condiții optime de bioconversie.....	102
4.4. Concluzii parțiale	104
5. Bioproducerea de etanol prin valorificarea deșeurilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală.....	105
5.1. Oportunitatea studiului.....	105
5.2. Materiale și metode de analiză.....	106
5.2.1. Materiale.....	106
5.2.2. Metode de analiză și de prelucrare a datelor experimentale.....	106
5.2.3. Infrastructura de cercetare.....	118
5.3. Rezultate și discuții.....	119
5.3.1. Optimizarea bioconversiei în etanol a substraturilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală.....	119
5.3.2. Modelarea matematică a procesului de bioconversie în etanol a substraturilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală.....	125
5.4. Concluzii parțiale.....	147
6. Bioproducerea de biomasă fungică prin valorificarea deșeurilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală.....	148
6.1. Oportunitatea studiului.....	148
6.2. Materiale și metode de analiză.....	149
6.2.1. Materiale.....	149
6.2.2. Metode de analiză și interpretare a datelor experimentale.....	150
6.2.3. Infrastructura de cercetare.....	152
6.3. Rezultate și discuții.....	153
6.3.1. Studiul potențialului de creștere a mucegaiului <i>Geotrichum candidum</i> sp. MIUG 2.15 pe substrat celulozic mixt derivat din hârtie reziduală, în sistem de fermentare tip SSF (Solid State Fermentation)	153
6.3.2. Optimizarea bioproducerii de SCP prin utilizarea metodei analizei suprafeței de răspuns.....	154
6.4. Concluzii parțiale.....	167
7. Schema bloc pe operații unitare pentru biovalorificarea deșeurilor celulozice din hârtie prin utilizarea enzimelor și a culturilor starter fungice.....	168
8. Concluzii generale.....	170
9. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective.....	172
9. Diseminarea rezultatelor cercetărilor.....	173
10. Referințe bibliografice.....	174
Anexe.....	189

Lista figurilor.....	190
Lista tabelelor.....	194
Cromatograme HPLC.....	197

OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT

În contextul actual al tendințelor moderne ale cercetărilor privind biovalorificarea deșeurilor și conversia în produse cu valoare economică, teza de doctorat, *Biovalorificarea celulozei din hârtie reziduală prin utilizarea enzimelor și a culturilor starter fungice*, aduce o serie de contribuții originale cu valoare de cercetare fundamentală și aplicativă, cu importanță în biovalorificarea deșeurilor din hârtie, cu un conținut ridicat de celuloză, pentru producerea de bioetanol și proteine fungice (SCP, engl. *Single Cell Protein*).

În acord cu obiectivele științifice generale, în realizarea tezei de doctorat s-a vizat parcurgerea următoarelor etape de cercetare:

1. Stabilirea condițiilor fizico-chimice și enzimaticice de prelucrare a unui substrat celulozic, obținut din trei tipuri de hârtie reziduală (de ziar, de scris, carton), combinate în proporții egale (1:1:1), în vederea obținerii unui grad de hidroliză avansat.
2. Studiul condițiilor biotehnologice de bioconversie a substratului celulozic mixt, derivat din hârtie reziduală, în etanol, prin optimizarea funcționalității corelate a biocatalizatorilor (enzime și drojdii fermentative) în cele două etape principale ale procesului biochimic, hidroliza enzimatică a substratului și fermentația alcoolică.
3. Bioproducerea de proteine fungice prin valorificarea atât a substratului celulozic mixt, cât și a rezidului rezultat de la fermentația alcoolică, prin utilizarea unei tulpini selecționate de *Geotrichum candidum*, cu potențial celulozic, capabilă să realizeze randamente sporite de proteină de calitate.

Strategia de cercetare a urmărit o abordare multidisciplinară a studiilor din domeniile microbiologie, biochimie, biotehnologie aplicată, modelare matematică și interpretare statistică a datelor experimentale, care s-au realizat utilizând infrastructura modernă de cercetare din dotarea Platformei Bioaliment (Centru integrat de cercetare și formare pentru biotehnologie aplicată), a Laboratorului de Analize Fizico-Chimice și Microbiologie ale Alimentelor, din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea „Dunărea de Jos” Galați, și a Colegiului de Industrie Alimentară „Elena Doamna”, Galați.

Rezultatele cercetărilor realizate aduc o serie de contribuții originale, cu valoare științifică și aplicativă, și s-au diseminat prin publicarea a 6 lucrări științifice, dintre care 2 articole în curs de publicare în reviste cotate ISI și 4 articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale, doctoranda având calitatea de prim autor la 2 dintre acestea.

Studiul documentar, prezintă pe parcursul a trei subcapitole, o sinteză a datelor din literatura de specialitate, cu referire la tipurile de deșeuri celulozice, volumul acestora și gradul de valorificare la nivel național și internațional și totodată la implicațiile

biotehnologiei în valorificarea deșeurilor celulozice pentru producerea de produse cu valoare economică.

Capitolul 1. „Celuloza, caracteristici fizico-chimice și biochimice” prezintă structura și proprietățile fizico-chimice ale celulozei, compoziția biomasei celulozice din diverse tipuri de materiale și posibilitățile de biovalorificare a celulozei din deșeuri.

Capitolul 2. „Posibilități de biovalorificare a celulozei din deșeuri” prezintă potențialul microorganismelor de a biotransforma celuloza, particularități morfo-fiziologice ale mucegaiurilor, activ producătoare de celulaze, creșterea și multiplicarea mucegaiurilor în diferite sisteme de cultivare, modalități de utilizare a preparatelor enzimatiche comerciale în biotransformarea celulozei din deșeuri și cinetica reacțiilor de hidroliză enzimatică a celulozei.

Capitolul 3. „Procedee biotehnologice de valorificare a deșeurilor celulozice” prezintă tipurile de pretratamente aplicate materialelor celulozice, procesul de hidroliză enzimatică a celulozei și căile de biovalorificare superioară a deșeurilor celulozice prin bioproducerea de etanol și biomasă proteică.

Rezultate experimentale și contribuții, prezintă rezultatele cercetărilor proprii privind identificarea unor căi avantajoase de tratament fizico-chimic și enzimatic al deșeurilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală, în vederea bioconversiei în etanol, sau pentru producerea de suplimente proteice furajere, aplicând fermentația în fază solidă (în sistem SSF).

Capitolul 4. „Studii preliminare privind biotransformarea deșeurilor lignocelulozice” prezintă rezultatele cercetărilor proprii referitoare la stabilirea tipului de pretratament corespunzător substratului celulozic mixt format din trei tipuri de hârtie reziduală (ziar, de scris, carton), amestecate în proporții egale (1:1:1) și rumeguș, s-au studiat condițiile fizico-chimice de pretratament și optimizarea hidrolizei enzimatiche, în vederea creșterii randamentului de bioconversie.

Capitolul 5. „Bioproducerea de etanol prin valorificarea deșeurilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală” prezintă rezultatele cercetărilor proprii referitoare la optimizarea condițiilor biotehnologice pentru etapa de hidroliză enzimatică și etapa de fermentație alcoolică. S-a urmărit ca cele două etape să decurgă simultan pentru creșterea eficienței economice, creșterea productivității și reducerea timpului de tratament. S-a urmărit efectul individual și corelativ al principalilor factori fizico-chimici și biologici care intervin și condiționează funcționalitatea optimă a celor două etape ale bioprocesului.

Capitolul 6. „Bioproducerea de biomasă fungică prin valorificarea deșeurilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală” prezintă rezultatele cercetărilor proprii referitoare la valorificarea superioară a substratului celulozic mixt derivat din hârtie reziduală și carton pentru obținerea de SCP, prin cultivarea tulpinii selecționate *Geotrichum candidum* MIUG 2.15,

în sistem de cultivare în fază solidă (SSF, engl, *Solid State Fermentation*). Metoda analizei suprafeței de răspuns (RSM) a fost utilizată pentru analiza efectului corelativ a trei variabile independente, concentrația în îngrășământ complex, raportul solid:lichid și timpul de cultivare asupra creșterii și biosintezei de proteine prin cultivarea mucegaiului *Geotrichum candidum* MIUG 2.15, pe un mediu semisolid format din reziduuri de hârtie (hârtie de scris, hârtie ziar și carton), combinate în raport masic de 1:1:1, pretratate în prealabil prin hidroliză acidă și tratament termic.

Teza cuprinde 201 pagini, în care sunt prezentate 53 de tabele și 78 de figuri, pentru realizarea căreia s-au analizat 168 de referințe bibliografice, majoritatea publicații după anul 2000.

Capitolul 4. Studii preliminare privind biotransformarea deșeurilor lignocelulozice

Oportunitatea studiului

Pretratamentul este necesar pentru a îmbunătăți biodisponibilitatea biomasei celulozice, pentru a face celuloza mai accesibilă atacului enzimatic, pentru creșterea randamentului de bioconversie în glucide fermentescibile.

Studiul proprietăților catalitice ale unei enzime se realizează urmărind modul de acțiune al acesteia. În acest scop, enzima se combină cu substratul în anumite condiții de reacție (pH, temperatură etc.), iar efectul se observă măsurând viteza de transformare a substratului sau viteza de formare a produsului de reacție.

Materiale

Substrat celulozic mixt. Pentru efectuarea cercetărilor experimentale s-a folosit un amestec de materiale celulozice provenit din deșeurile urbane și anume: hârtie birou, hârtie ziar, carton și rumeguș din lemn.

Preparat enzimatic comercial. Enzima utilizată în procesele de hidroliză enzimatică este Celulaza Onozuka R 10 - din *Trichoderma viride* (Merk-Germania), cu activitate enzimatică declarată de 1U/mg.

O unitate de activitate celulozică reprezintă cantitatea de enzimă care eliberează 1μM glucide reducătoare/minut (dozare prin metoda DNS), în condițiile de lucru (pH = 4,5, temperatura 45°C).

Metode de analiză

- Dozarea celulozei brute (metoda de hidroliză cu acizi și alcalii)
- Dozarea ligninei
- Dozarea glucidelor totale (metoda cu fenol)

- Dozarea glucidelor reducătoare (metoda cu acid 3,5 dinitrosalicilic)
- Determinarea conținutului în cenușă
- Analiza HPLC a produșilor de hidroliză enzimatică a hârtiei

Rezultate și discuții

Analiza eficienței unor pretratamente în modificarea recalcitranței unor substraturi lignocelulozice

Au fost testate o serie de pretratamente cum ar fi: măcinarea, tratament termic în cuptorul de calcinare, tratament chimic cu solvenți organici, NaOH și H₂SO₄ în diferite concentrații. Substratul cel mai reactiv s-a dovedit a fi hârtia de scris, pentru care conținutul maxim de glucide reducătoare eliberate în urma hidrolizei s-a situat la valoarea de 0,48 mg/mL, în condițiile de pretratament testate. S-a constatat, în urma testării diferitelor tipuri de pretratamente, că cel mai eficient este pretratamentul chimic, realizat la 120°C, timp de 1 oră, în atmosferă umedă.

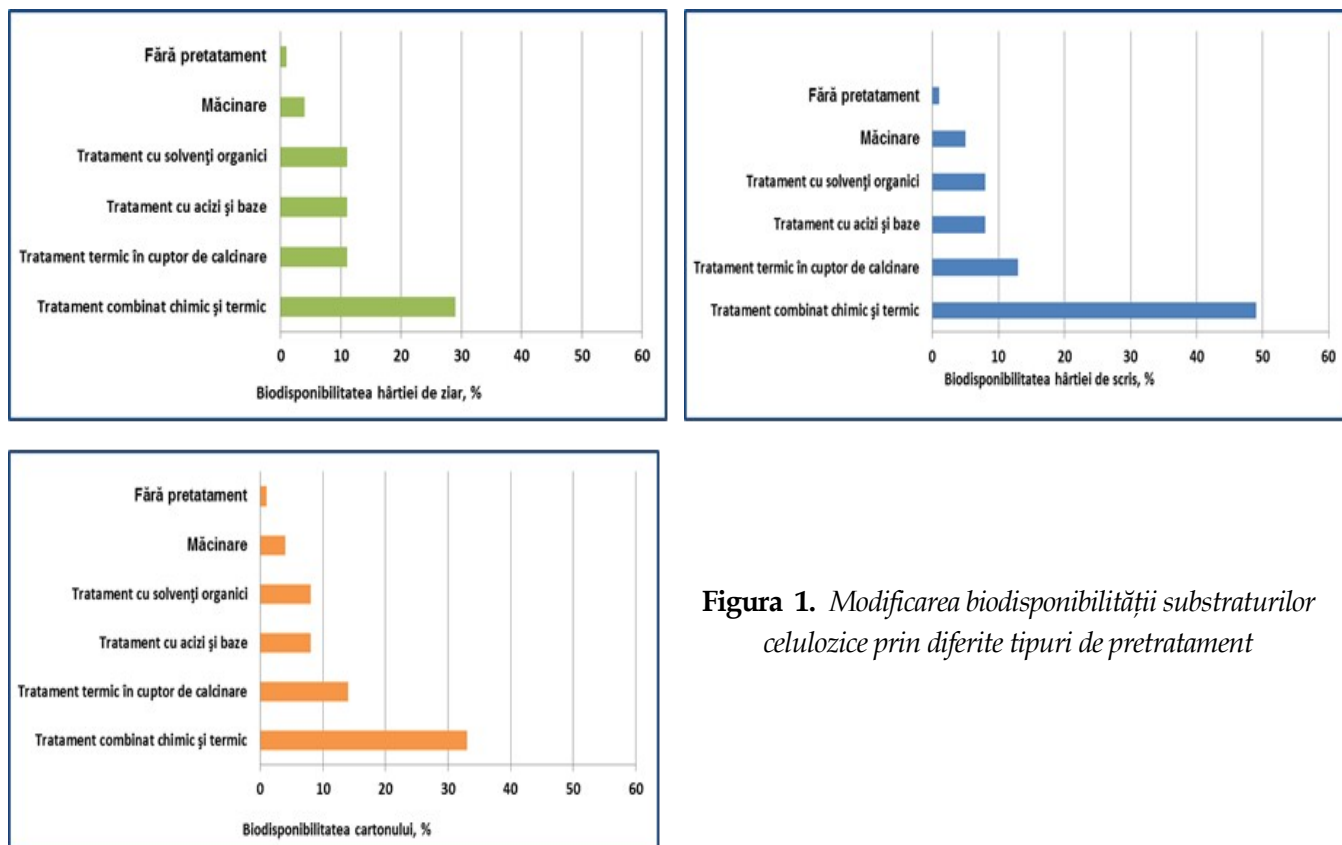


Figura 1. Modificarea biodisponibilității substraturilor celulozice prin diferite tipuri de pretratament

Studiul hidrolizei enzimatică a substraturilor celulozice pretratate

Influența concentrației în substrat asupra cineticii reacției de hidroliză enzimatică a celulozei a fost studiată utilizând ca substrat carboximetilceluloză. Cu datele obținute s-a trasat curba de variație a vitezei de reacție, în funcție de concentrația de substrat, în reprezentare Michaelis-Menten (figura 2). S-a reprezentat variația liniară Lineweaver-Burk, în coordonate $1/v = f(1/[S])$ (figura 3), unde v se exprimă în μM glucoză/minut, iar $[S]$, în mg/mL .

S-au calculat parametrii cinetici:

$K_m = 6,25$ și $v_{\max} = 5 \mu\text{M}$ glucoză/minut

și raportul optim enzimă:substrat este de 1UE:2g substrat.

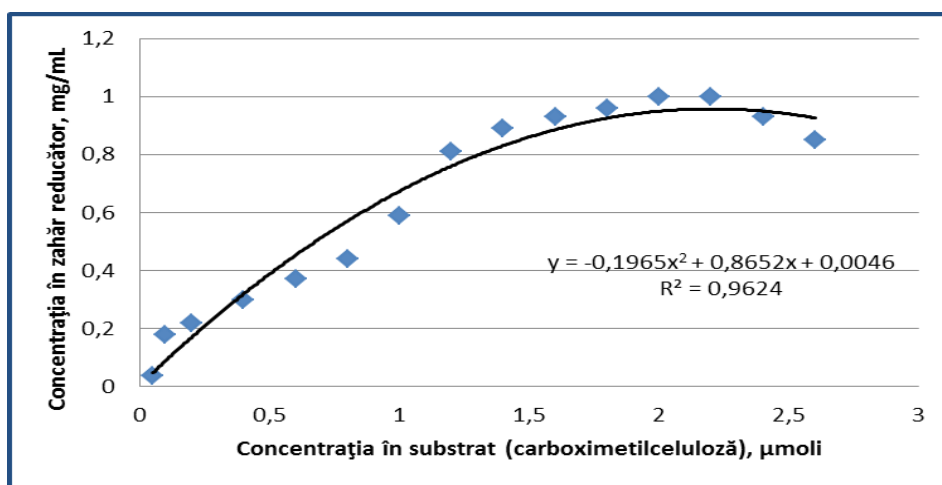


Figura 2. Variația vitezei de hidroliză enzimatică în funcție de concentrația substratului

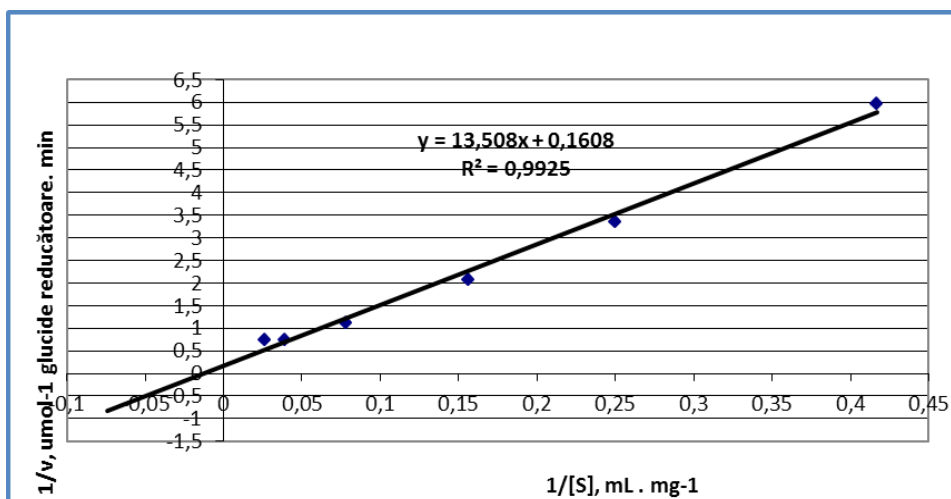


Figura 3. Cinetica enzimatică în reprezentare Lineweaver-Burk

Pentru a studia cinetica acumulării produselor de reacție, respectiv a glucidelor reducătoare acumulate, a fost studiată influența concentrației substratului asupra vitezei de reacție, pentru substratul celulozic hârtia de scris.

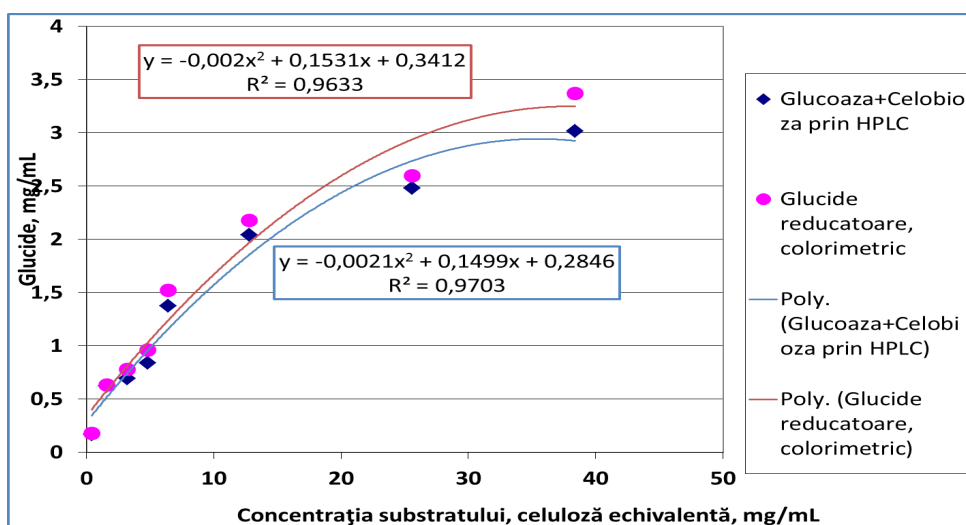


Figura 4. Producții de hidroliză enzimatică a celulozei din hârtie de birou, determinați colorimetric și cromatografic

Alura dinamicii acumulării produșilor de reacție este foarte asemănătoare atât la dozarea prin metoda HPLC cât și la dozarea prin metoda spectrofotometrică. S-a observat îmbunătățirea comportamentului cinetic cu creșterea concentrației de enzimă.

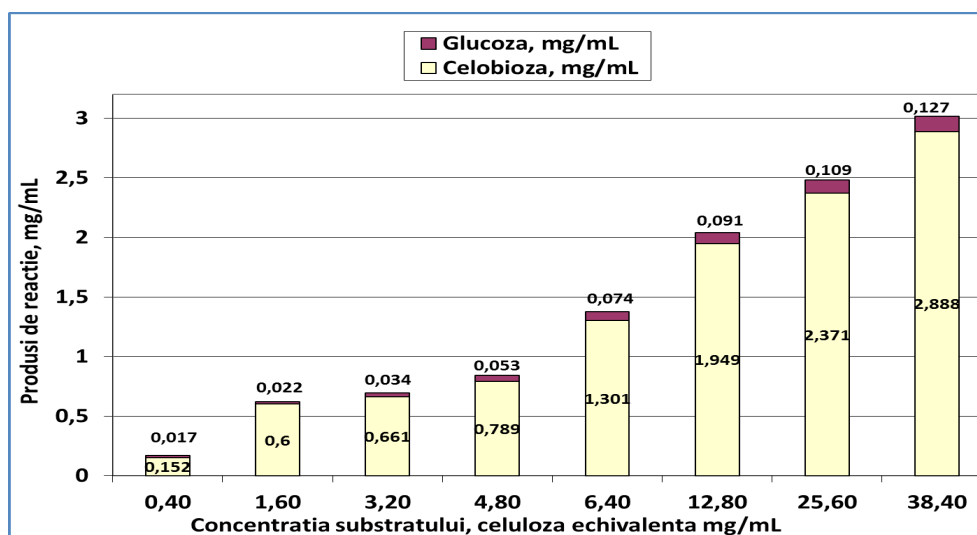


Figura 5. Influența concentrației hârtiei de birou asupra acumulării produșilor de reacție ai celulazei, determinați cromatografic

Ponderea glucozei în raport cu celbioza, ca produși de reacție, este mică, ceea ce denotă o slabă activitate celobiazică secundară a preparatului celulozic utilizat în experiment.

A fost studiată influența temperaturii, a pH-ului a adaosului de agent activ de suprafață asupra hidrolizei enzimaticе și dinamica acumulării de zahăr reducător în decursul hidrolizei enzimaticе a celulozei.

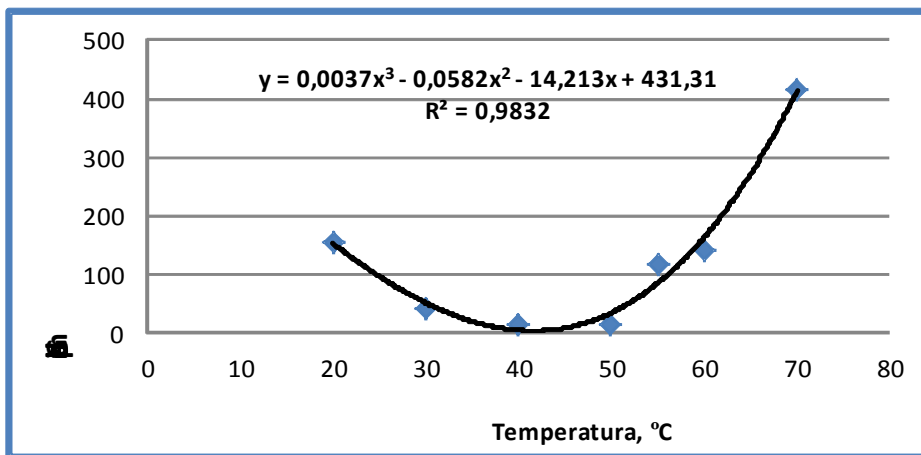


Figura 6. Variația gradului de polimerizare al celulozei din amestecul de material celulozic 1:1:1 în funcție de temperatură

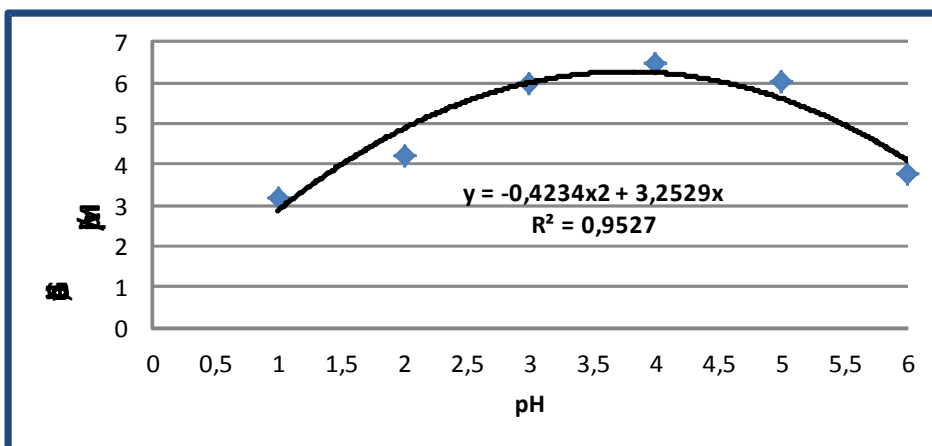


Figura 7. Efectul pH-ului în hidroliza enzimatică a substratului celulozic mixt pretrat

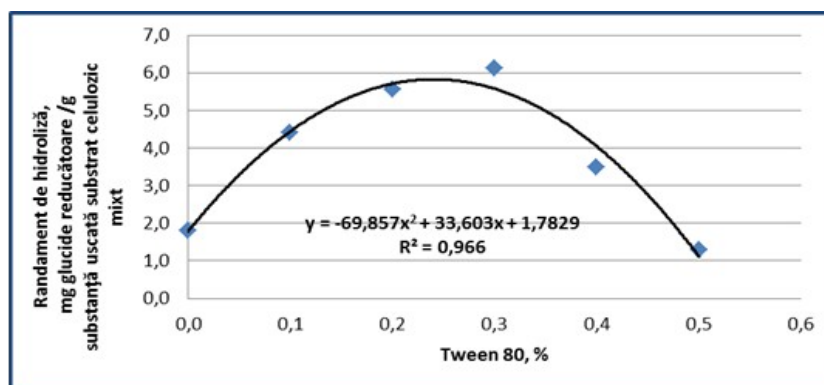


Figura 8. Influența adaosului de Tween 80 asupra funcționalității preparatului enzimatic pentru hidroliza substratului celulozic

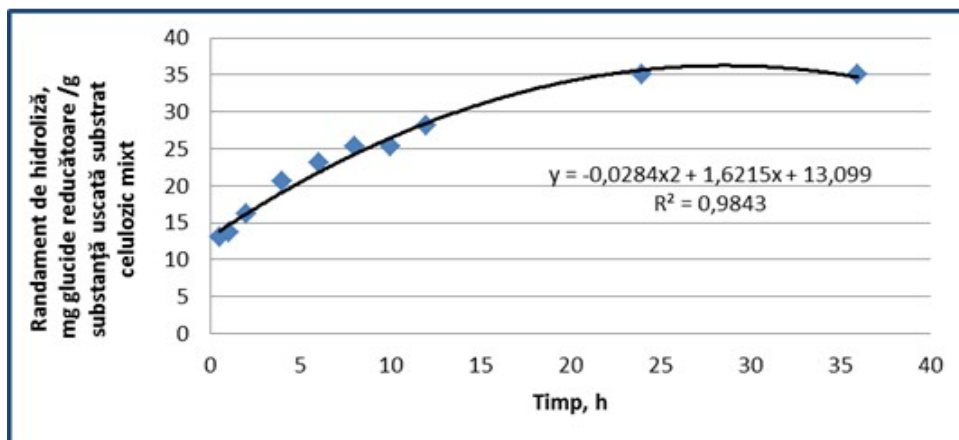


Figura 9. Dinamica acumulării de zahăr reducător în decursul hidrolizei enzimatică a celulozei

Concluzii parțiale

- S-a studiat eficiența unor diverse tratamente fizico-chimice aplicate unor materiale din deșeuri lignocelulozice (hârtie de scris, ziar, carton și rumeguș), precum măcinarea, calcinarea, tratamentul chimic cu solvenți organici, cu soluții de NaOH și H₂SO₄ în concentrații de 0,1; 0,5; 1; și 2% și la diferite temperaturi: temperatura mediului ambiant, 50°C, 75°C și 120°C, în mediu umed și uscat, în vederea stabilirii condițiilor de creștere a biodisponibilității compușilor polimerici: celuloza, hemiceluloze și reducerea rezistenței.
- Cele mai eficiente pretratamente s-au dovedit cele în care s-a combinat efectul tratamentului chimic cu acizi sau baze (2% H₂SO₄ și 2% NaOH, cu tratament termic la temperatura de 120°C, în mediu umed (în autoclav), timp de 1h. Procedul atinge eficiență maximă la 1 h de pretratament.
- Hârtia de scris și cartonul s-au dovedit a fi cele mai puțin rezistente substraturi celulozice, având o biodisponibilitate mai mare după pretratament.
 - S-au studiat și optimizat condițiile de bioconversie a substraturilor celulozice, individual și în combinație (hârtie de scris-ziar-carton, în proporții egale). Comportamentul enzimei a fost analizat comparativ utilizând carboximetilceluloză comercială (substanță pură), în calitate de substrat.

Condițiile optime de bioconversie a substratului celulozic mixt, după pretratament combinat, chimic și la temperatura de 120°C, sunt:

- raportul enzimă/substrat: 0,5 UE/g substrat;
- temperatura: 45°C ... 48°C;
- pH-ul mediului de reacție: 4,5-4,8;
- adaosul de agenți activi de suprafață: 0,3% Tween 80;
- timp de reacție: 24 ore.

Capitolul 5. Bioproducerea de etanol prin valorificarea deșeurilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală

Oportunitatea studiului

Biotransformarea materialelor celulozice prin intermediul preparatelor enzimatiche comerciale sau a microorganismelor producătoare de celulaze, conduce la obținerea de compuși chimici simpli, din care prin numeroase procese fermentative (aerobe sau anaerobe) se poate obține o gama largă de compuși cu valoare de suplimente alimentare și furajere, biocombustibili, solvenți, enzime etc.

Având în vedere aceste oportunități, în prezentul studiu s-a vizat analiza și optimizarea condițiilor biotehnologice de bioconversie a polimerilor glucidici din deșeuri de hârtie și carton în bioetanol.

Materiale

- **Substrat celulozic mixt.** Un amestec din trei tipuri de deșeuri celulozice, hârtie de scris, hârtie ziar și carton, combinate în raport de masă 1:1:1, măcinate, s-a tratat preliminar cu 2% H₂SO₄ (raport solid:lichid de 1:7 m/v), apoi s-a tratat termic la temperatura de 120°C și 1 atm., timp de 1 h, în autoclav. Substratul celulozic pretrat s-a spălat apoi cu apă, de mai multe ori, până la pH neutru. Materialul a fost apoi uscat la temperatura de 60°C (cca. 80% substanță uscată), timp de 6 ore și apoi măcinat. Materialul celulozic mixt obținut a fost păstrat în flacoane de sticlă închise cu dop rodat.

- **Preparat enzimatic comercial.** Enzima utilizată în procesele de hidroliză enzimatică este Celulaza Onozuka R 10 - din *Trichoderma viride* (Merk-Germania), cu activitate enzimatică declarată de 1U/mg.

- **Culturi starter de drojdii** cu potențial fermentativ, *Sachharomyces cerevisiae* MIUG 1, *Saccharomyces cerevisiae* MIUG 2 și *Sachharomyces cerevisiae* MIUG 3, din Colecția de Microorganisme a Platformei Bioaliment (acronim MIUG) din cadrul Facultății „Știința și Ingineria a Alimentelor” Galați, păstrate în culturi stoc, la temperatura de 4°C, după cultivare pe must de malț și agar.

Metode de analiză

- Dozarea glucidelor totale (metoda cu fenol)
- Dozarea glucidelor reducătoare (metoda cu acid 3,5 dinitrosalicilic)
- Determinarea concentrației alcoolice cu kitul pentru etanol
- Tehnica Placket-Burman de selecție a factorilor cu relevanță în bioprocesele de hidroliză și fermentație alcoolică
- Metoda analizei suprafeței de răspuns pentru optimizarea procesului de bioconversie

Rezultate și discuții

Optimizarea bioconversiei în etanol a substraturilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală

Selecția tulpinii de drojdie s-a realizat utilizând culturi de drojdii cu potențial fermentativ. Pentru tulpina de drojdie selectată s-a studiat influența adăugării suplimentului nutritiv.

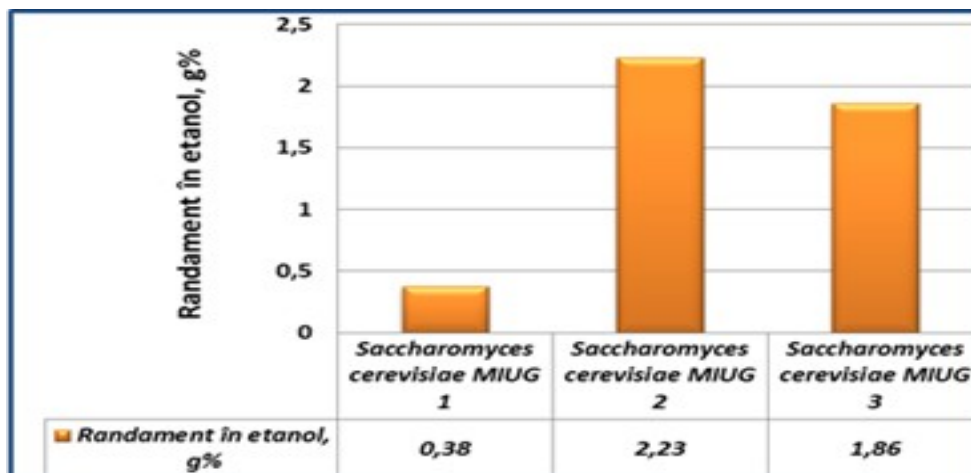


Figura 10. Potențialul fermentativ al tulpinilor de drojdii *Saccharomyces cerevisiae*, pe substrat celulozic mixt, după hidroliză enzimatică

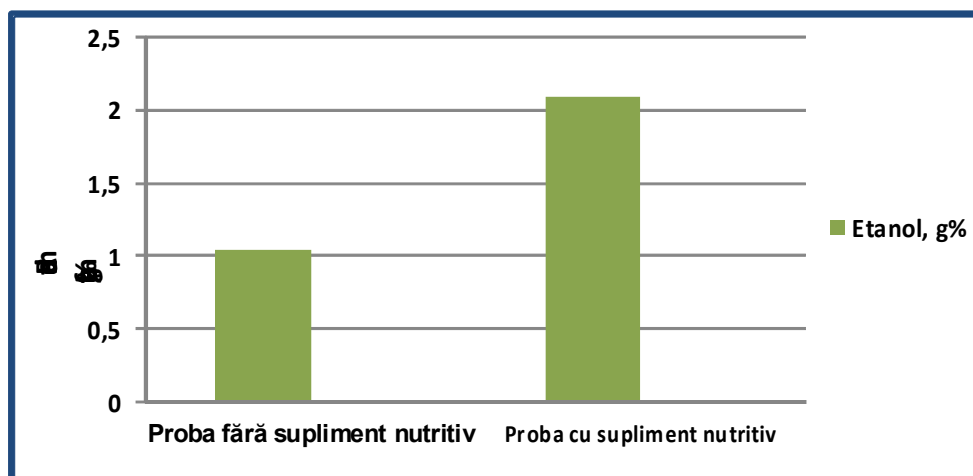


Figura 11. Eficiența utilizării suplimentului nutritiv pentru îmbunătățirea randamentului în etanol

Procesul fermentativ a fost studiat din punctul de vedere al influenței următorilor factori: temperatură, raportul solid-lichid în mediul de fermentare, pH.

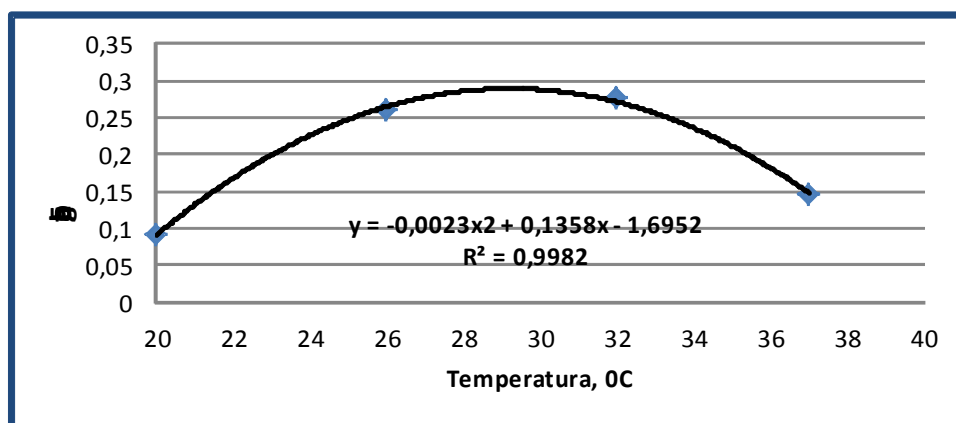


Figura 12. Eficiența procesului fermentativ în funcție de temperatură

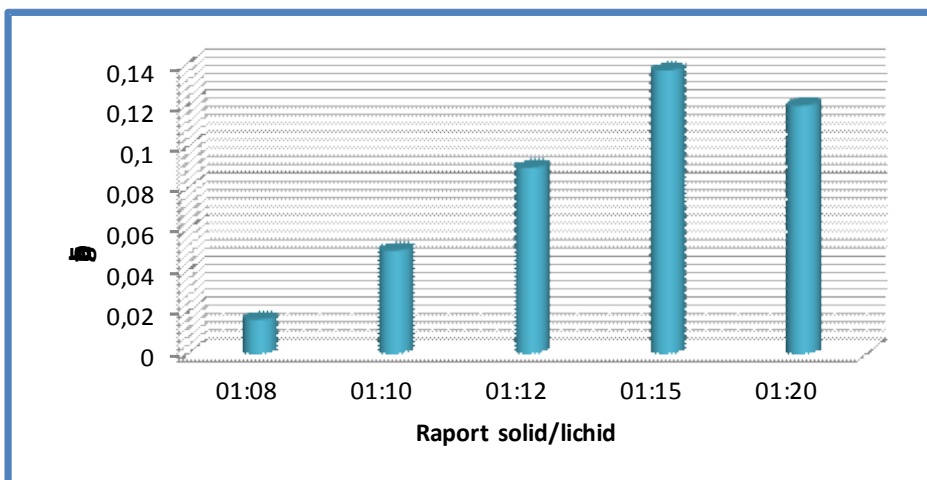


Figura 13. Eficiența procesului de bioconversie a substratului celulozic mixt, în funcție de raportul solid-lichid în mediu

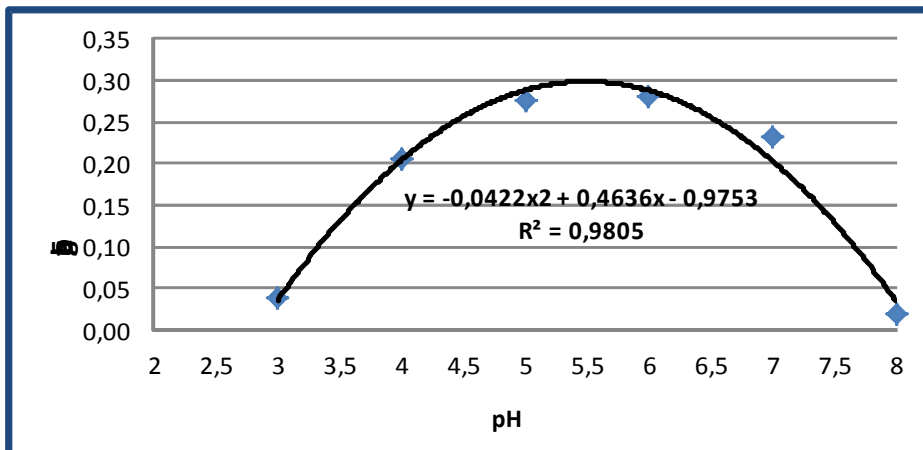


Figura 14. Evoluția fermentației alcoolice a substratului celulozic mixt pretrat și hidrolizat enzimatic, în funcție de pH

S-au identificat condițiile fizico-chimice de bioconversie și anume: adaosul de 1% îngrășământ complex (sursa de azot); temperatura de reacție 32°C; pH =4...5,5; raportul solid:lichid 1:15 și timpul de fermentare 48 h.

Evaluarea factorilor semnificativi care influențează procesul biotehnologic prin analiza Plackett-Burman

Factorii care au fost selectați pentru analiză sunt: concentrația în substrat, concentrația în enzimă, concentrația în inocul, temperatura de hidroliză enzimatică, raportul solid:lichid, pH-ul, temperatura de fermentare, timpul de fermentare, concentrația în supliment nutritiv (azot), adăugarea suplimentară de enzimă pe parcursul fermentației alcoolice.

Tabelul 1. Nivele de variație a variabilelor selectate pentru analiza Plackett –Burman

Variabile independente	Nivel minim	Nivel maxim
	(-1)	(+1)
A - concentrația în substrat, g	15	35
B - concentrația în enzimă, UE/g substrat	50	100
C - concentrația în inocul, ufc*/g substrat	10 ⁵	10 ⁷
D - temperatura de hidroliză enzimatică, °C	40	55
E - raportul solid:lichid	1/10	1/20
F - pH-ul	4	5,5
H - timpul de fermentare, h	72	168
I - concentrația în supliment nutritiv, %	0,05	0,8
J - temperatura de fermentare, °C	27	37
K - adăugarea suplimentară de enzimă UE/g substrat	20	40

– *ufc-unități formatoare de colonii

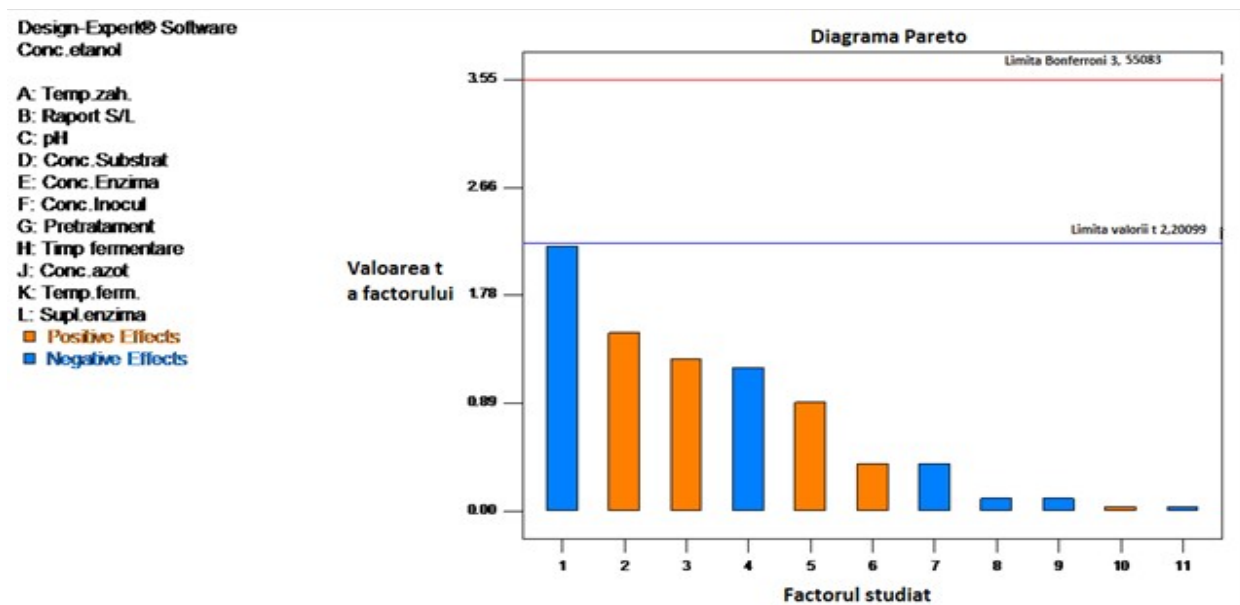


Figura 15. Diagrama Pareto ce descrie influența factorilor semnificativi în procesul de bioconversie a substratului celulozic mixt în bioetanol

T a b e l u l 2. Planificarea experimentală în analiza Plackett-Burman privind bioconversia substratului celulozic mixt în etanol

Proba	A	B	C	D	E	F	H	J	K	L	Randament în etanol, g/100 g substanță uscată material celulozic mixt
1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	0,84
2	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	10,50
3	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	9,00
4	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	5,25
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	4,12
6	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	4,37
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	9,00
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	9,00
9	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	4,81
10	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	9,18
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4,12
12	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	21,8

Conform analizei statistice a datelor experimentale s-au stabilit factorii cu cea mai mare influență asupra procesului de bioconversie: raportul solid/lichid, pH-ul, concentrația în enzimă, dimensiunea inoculului, temperatura de fermentare.

Evaluarea efectului corelativ al factorilor, concentrația de enzimă, raportul solid:lichid și concentrația de inocul asupra procesului biotehnologic

Tabelul 3. Variabilele independente și nivele de variație ale factorilor

Variabile independente	Valorile codificate ale variabilelor					
	Cod	- α	-1	0	+1	+ α
Concentrația în enzimă, UE/g substrat	A	1,8	2	4	6	7
Raportul solid:lichid	B	1:8	1:10	1:15	1:20	1:22
Concentrația în inocul, log ufc/g substrat	C	4,59	5	6	7	7,41

Tabel 4. Matricea experimentală a experimentelor planificate în CCD

Varinanta	Concentrația în enzimă, UE/g substrat		Raportul solid/lichid		Dimensiunea inoculului, log ufc/g substrat		Etanol, valoarea experimentală, g/100 g su material celulozic	Etanol, valoarea estimată, g/100 g su material celulozic
	Valoarea codificată	Valoare	Valoarea codificată	Valoare	Valoarea codificată	Valoare		
1	0	4	0	1:15	0	6	0,53	0,53
2	1	6	1	1:20	-1	5	0,08	0,08
3	1,41	7	0	1:15	0	6	0,33	0,33
4	-1,41	1,8	0	1:15	0	6	0,60	0,6
5	0	4	-1,41	1:8	0	6	0,21	0,21
6	0	4	0	1:15	0	6	0,55	0,43
7	1	6	-1	1:10	1	7	0,40	0,4
8	0	4	0	1:15	0	6	0,19	0,43
9	-1	2	1	1:20	1	7	0,53	0,43
10	0	4	0	1:15	-1,41	4,59	0,32	0,32
11	-1	2	-1	1:10	-1	5	0,26	0,26
12	0	4	0	1:15	0	6	0,30	0,43
13	0	4	1,41	1:22	0	6	1,18	1,18
14	0	4	0	1:15	1,41	7,41	4,11	4,11
15	0	4	0	1:15	0	6	0,56	0,43

Modelul matematic rezultat este:

$$Y = 0.43 - 0.095A + 0.34B + 1.34C + 1.19AB + 0.36AC - 0.018BC + 0.019A^2 + 0.13B^2 + 0.89C^2 + 1.16ABC \quad (1)$$

În urma modelării matematice a procesului de bioproducere a etanolului s-au obținut parametrii optimi ai mediului de biosinteză: inocul - 10^6 celule de drojdie/g substrat, raportul solid/lichid - 1:15 și concentrația în enzimă - 4 UE/g substrat.

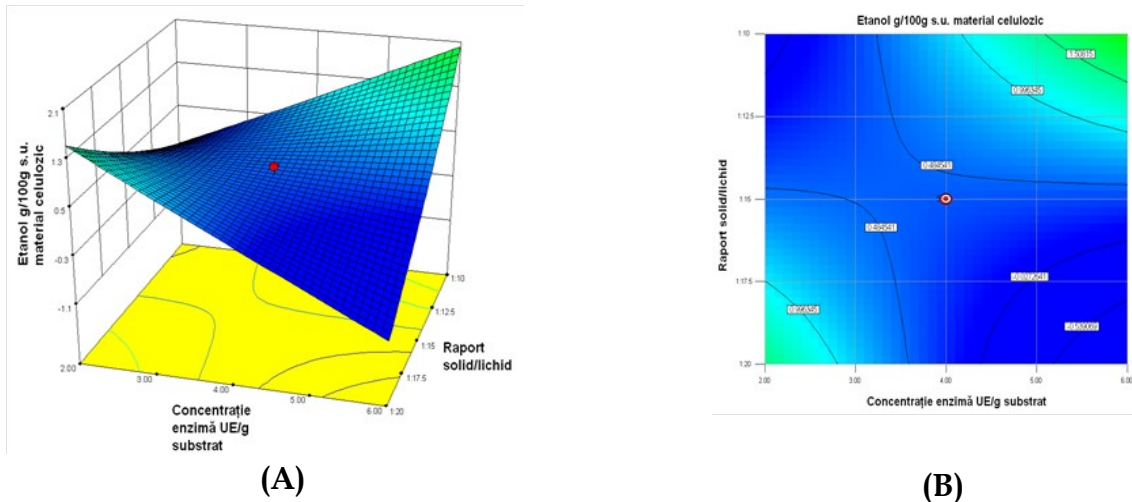


Figura 16. Suprafața de răspuns (A) și diagrama de contur (B) prezentând efectul corelativ al concentrației de enzimă și a raportului solid:lichid asupra randamentului de etanol

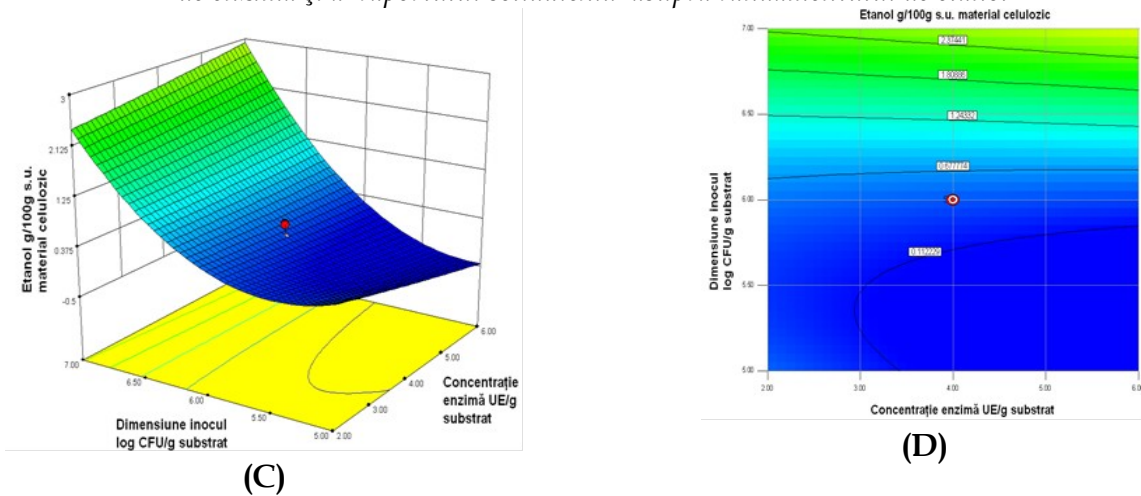


Figura 17. Suprafața de răspuns (C) și diagrama de contur (D) prezentând efectul corelativ al concentrației de enzimă și a concentrației în inocul asupra randamentului de etanol

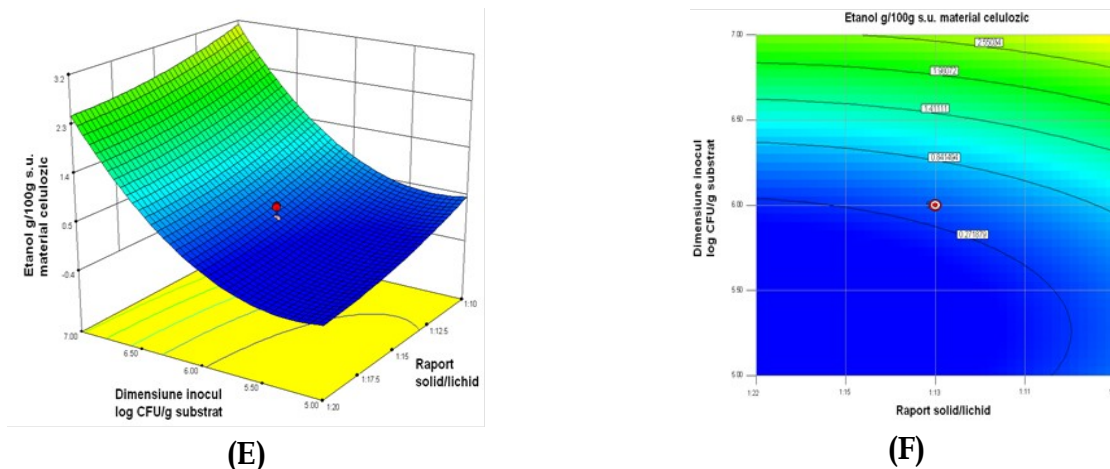


Figura 18. Suprafața de răspuns (E) și diagrama de contur (F) prezentând efectul corelativ al concentrației în inocul și a raportului solid:lichid asupra randamentului de etanol

Concluzii parțiale

- S-au studiat condițiile preliminare pentru fermentația alcoolică a substraturilor celulozice derivate din hârtie reziduală (de scris, ziar și carton), după pretratament în mediu acid și la temperaturi ridicate și hidroliză enzimatică cu preparat enzimatic comercial, de origine fungică.
- Prin studiul factorilor cu cea mai mare implicare s-a selecționat o tulpină de drojdie din specia *Saccharomyces cerevisiae* adaptată să fermenteze hidrolizatul obținut din amestecul celulozic mixt, și s-au identificat condițiile fizico-chimice de bioconversie și anume: adaosul de 1% îngrășământ complex (sursa de azot); temperatura de reacție 32°C; pH =4...5,5; raportul solid:lichid 1:15, timp de fermentare 48 h.
- Prin analiza Plackett-Burman, s-au stabilit efectul pozitiv și negativ al unor factori considerați cu influență asupra procesului de bioconversie și anume: concentrația de în substrat, concentrația de enzimă, concentrația în inocul, temperatura de hidroliză enzimatică, raportul solid:lichid, pH-ul, timpul de fermentare, concentrația în supliment nutritiv (azot), temperatura de fermentare, adăugarea suplimentară de enzimă, în timpul procesului fermentativ.
- Factorii semnificativi care influențează derularea procesului de bioconversie în etapa de hidroliză enzimatică și fermentație alcoolică sunt: raportul solid:lichid; pH-ul; concentrația de enzima; concentrația de inocul și temperatura de fermentație.
- Prin metoda analizei suprafeței de răspuns s-au identificat condițiile optime pentru derularea simultană a celor două etape ale bioprocesului (hidroliză enzimatică și fermentație alcoolică) și anume: concentrația în substrat, mai mare de 20g; concentrația în azot: mai mică de 0,5%; concentrația în enzimă: 4 UE/g substrat; concentrația în inocul: 10⁷ celule de drojdie/g substrat și raportul solid:lichid: 1:15. În aceste condiții s-a obținut un randament în etanol de 11,04 g kg etanol/100 kg materiale din deșeuri celulozice.

Capitolul 6. Bioproducerea de biomasă fungică prin valorificarea deșeurilor celulozice mixte, derivate din hârtie reziduală

Oportunitatea studiului

Obținerea de SCP prezintă importanță de cercetare fundamentală și aplicativă, precum și aplicații practice pentru diversificarea resurselor naturale de hrană, în continuă epuizare la nivel planetar. Producerea de SCP bazată pe valorificarea deșeurilor reprezintă un proces biotehnologic cu importanță economică deosebită, cu impact și pentru protecția mediului înconjurător. Prin multiplicare și formare de biomasă, microorganismele sintetizează proteine prin cultivare pe substraturi ieftine și ușor de procurat, îmbunătățindu-le valoarea nutritivă, prin biosinteza de material celular bogat în compuși bioactivi.

Materiale

Cultura starter - tulpina *Geotrichum candidum* MIUG 2.15 din Colecția de microorganisme a platformei de cercetare și formare BIOALIMENT (acronim MIUG). Cultura pură s-a conservat prin cultivare pe mediul cu agar (g/mL): glucoză 2%, peptonă 1%, extract de drojdie 0.5% și agar 2%, la temperatura de 4°C.

Substrat celulozic mixt-amestec din trei tipuri de deșeuri celulozice, hârtie de scris, hârtie ziar și carton, combinate în raport de masă 1:1:1, măcinate, s-a tratat preliminar cu 2% H₂SO₄ (raport solid:lichid de 1:7), apoi s-a tratat termic la temperatura de 120°C și 1 atm., timp de 1 h, în autoclav. Substratul celulozic pretrat s-a spălat apoi cu apă, de mai multe ori, până la pH neutru. Materialul a fost apoi uscat la temperatura de 60°C (cca. 80% substanță uscată), timp de 6 ore și apoi măcinat. Materialul celulozic mixt obținut a fost păstrat în flacoane de sticlă închise cu dop rodat.

Borhot rezidual rezultat după bioconversia amestecului celulozic mixt în etanol. Borhotul, ca deșeu rezultat în urma distilării alcoolului etilic, a fost uscat până la 80% substanță uscată.

Suplimente nutritive:

- îngrășământ complex cu următoarea compoziție: 33,5 % azot total, 16,7% azot amoniacal, 16,8% azot nitric;
- zer acid

Metode de analiză

- Cultivarea mucegaiului în sistem SSF
- Dozarea proteinelor - metoda Kjeldhal
- Metoda analizei suprafeței de răspuns pentru optimizarea procesului de bioconversie

Rezultate și discuții

Optimizarea bioproducerii de SCP prin utilizarea metodei analizei suprafeței de răspuns

Prin modelarea matematică a procesului de bioproducere a proteinelor s-a studiat contribuția următoarelor variabile: concentrației în azot, raportului solid:lichid și a timpului de cultivare.

Tabelul 5. Variabilele independente și valorile acestora pentru modelul experimental

Variabile independente	Valorile codificate ale variabilelor					
	Cod	-1,68	-1	0	+1	+ 1,68
Concentrația în azot, %	A	0	0,1	0,3	0,5	0,63
Raportul solid:lichid	B	1:3,3	1:4	1:5	1:6	1:6,7
Timp cultivare, zile	C	4	6	8	10	12

Ecuția finală a modelului este:

$$Y = 4,02 - 0,055A + 0,80B - 0,98C - 1,49AB + 1,42AC - 0,23BC + 0,11A^2 + 0,31B^2 + 0,55C^2 + 1,35ABC - 0,17A^2B + 1,23A^2C \quad (2)$$

Tabelul 6. Modelul experimental (condiții, răspuns) pentru procesul de obținere a SCP din deșeurile celulozice

Proba	Concentrația în azot anorganic, %		Raportul solid/lichid		Timpul de cultivare, zile		Concentrația de proteine, valoarea experimentală, %	Concentrația de proteine, valoarea estimată de model, %
	Valoarea codificată	Valoare	Valoarea codificată	Valoare	Valoarea codificată	Valoare		
1	-1	0,1	1	1:6	-1	6	12,079	12,079
2	-1	0,1	-1	1:4	-1	6	4,660	4,660
3	1	0,5	-1	1:4	1	10	9,066	9,066
4	0	0,3	0	1:5	0	8	2,978	4,020
5	0	0,3	-1,68	1:3	0	8	3,546	3,550
6	-1	0,1	-1	1:4	1	10	5,500	5,500
7	-1,68	0	0	1:5	0	8	4,415	4,420
8	1	0,5	-1	1:4	-1	6	7,977	7,980
9	0	0,3	1,68	1:7	0	8	6,250	6,250
10	1	0,5	1	1:6	1	10	9,608	9,610
11	0	0,3	0	1:5	1,68	12	3,942	3,940
12	1,68	0,7	0	1:5	0	8	4,230	4,230
13	-1	0,1	1	1:6	1	10	6,570	6,570
14	0	0,3	0	1:5	0	8	4,163	4,020
15	1	0,5	1	1:6	-1	6	4,030	4,030
16	0	0,3	0	1:5	-1,68	4	7,228	7,230
17	0	0,3	0	1:5	0	8	3,987	3,940
18	0	0,3	0	1:5	0	8	3,640	4,020
19	0	0,3	0	1:5	0	8	4,374	4,020

20	0	0,3	0	1:5	0	8	4,951	4,020
----	---	-----	---	-----	---	---	-------	-------

În urma modelării matematice a procesului de bioproducere a proteinelor s-a stabilit contribuția fiecărei variabile studiate pentru obținerea unui randament maxim în proteine:

- concentrația în azot anorganic - 0,3%
- raportul solid/lichid - 1:3,3
- timpul de cultivare - 8 zile.

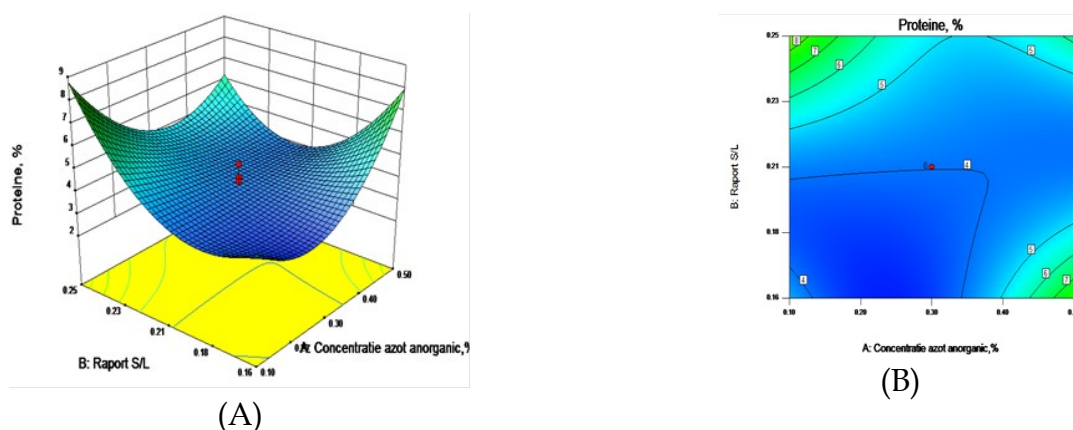


Figura 19. Suprafața de răspuns (A) și diagrama de contur (B) prezentând efectul concentrației în azot anorganic, a raportului solid:lichid, și efectele lor corelative asupra biosinteza de proteine fungice prin cultivarea pe substraturi celulozice derivate din hârtie a mucegaiului *Geotrichum candidum* MIUG 2.15

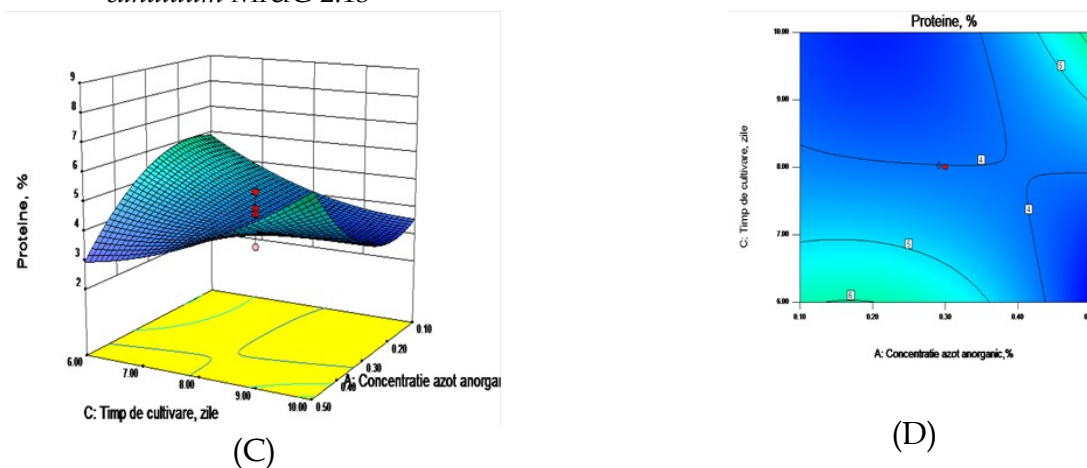


Figura 20. Suprafața de răspuns (C) și diagrama de contur (D) prezentând efectul concentrației în azot anorganic, a timpului de cultivare, și efectele lor corelative asupra biosinteza de proteine fungice prin cultivarea pe substraturi celulozice derivate din hârtie a mucegaiului *Geotrichum candidum* MIUG 2.15

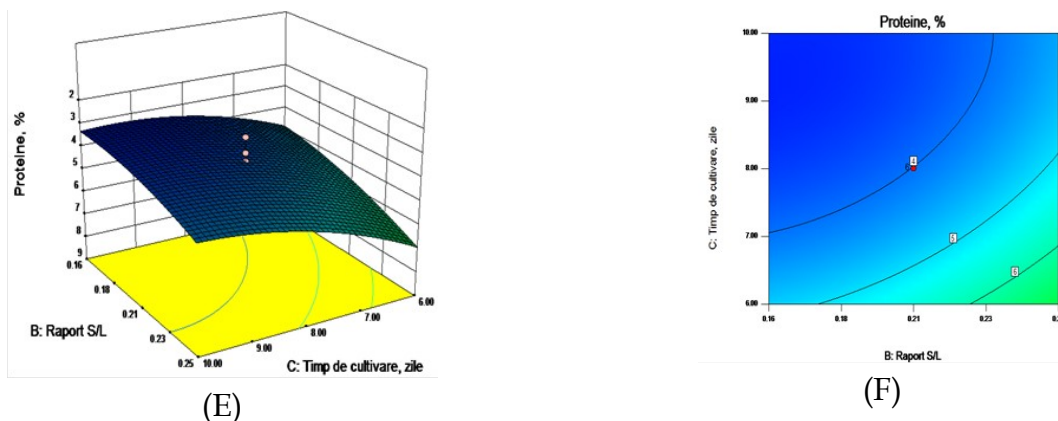


Figura 21. Suprafața de răspuns (E) și diagrama de contur (F) prezentând efectul raportului solid/lichid, a timpului de cultivare, și efectele lor corelative asupra biosinteza de proteine fungice prin cultivarea pe substraturi celulozice derivate din hârtie a mucegaiului *Geotrichum candidum* MIUG 2.15

Mediul fermentat obținut a fost caracterizat pentru a stabili gradul de valorificare a celulozei din substrat și gradul de îmbogățire a valorii nutritive prin acumularea de biomasă fungică și biosinteza de proteine, astfel conținutul în celuloză al substratului s-a redus considerabil de la 65% (g/g) în mediul de cultură la 12% (g/g) în mediul fermentat ceea ce reprezintă o scădere de aproximativ 5,5 ori.

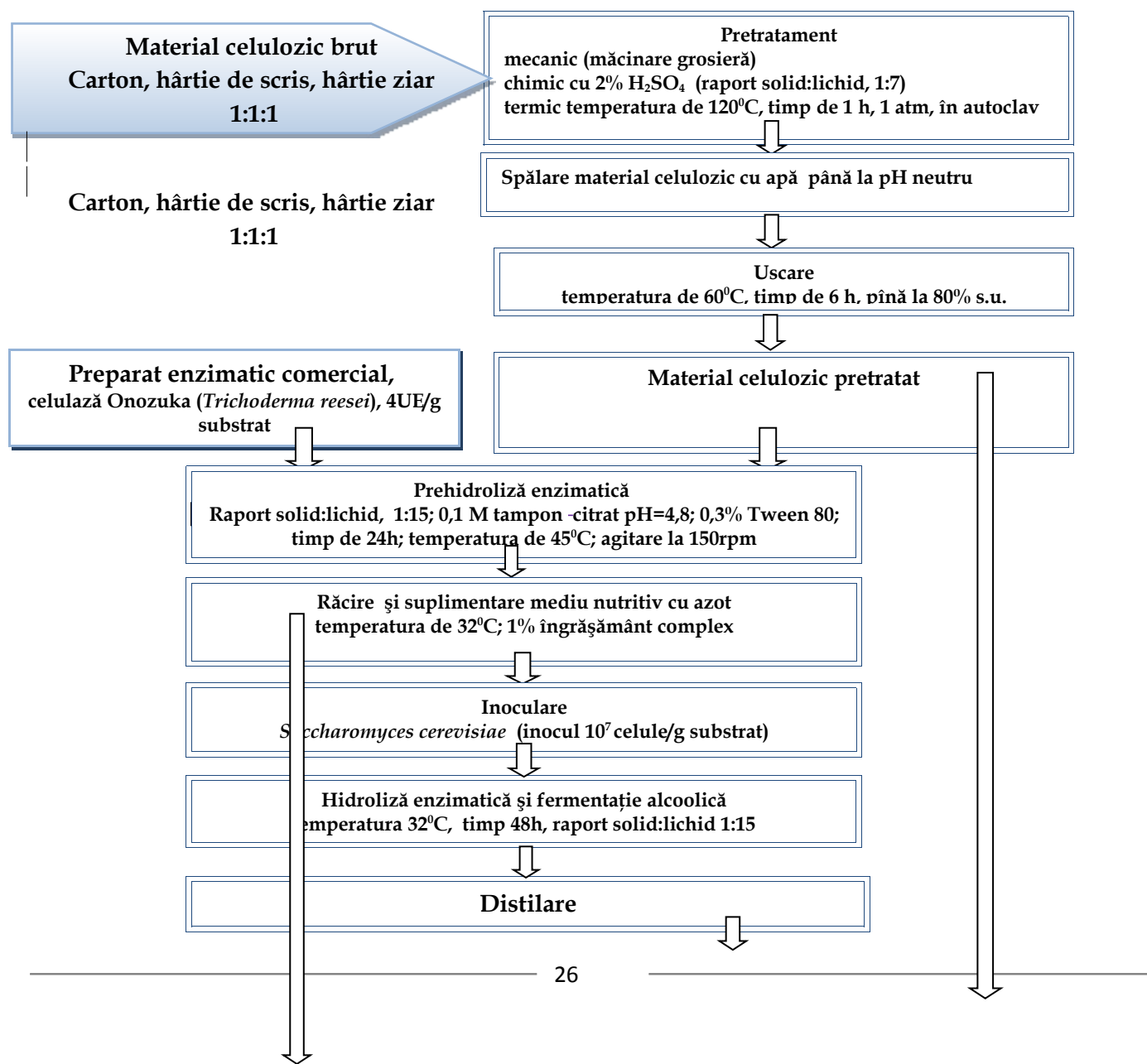
Concluzii parțiale

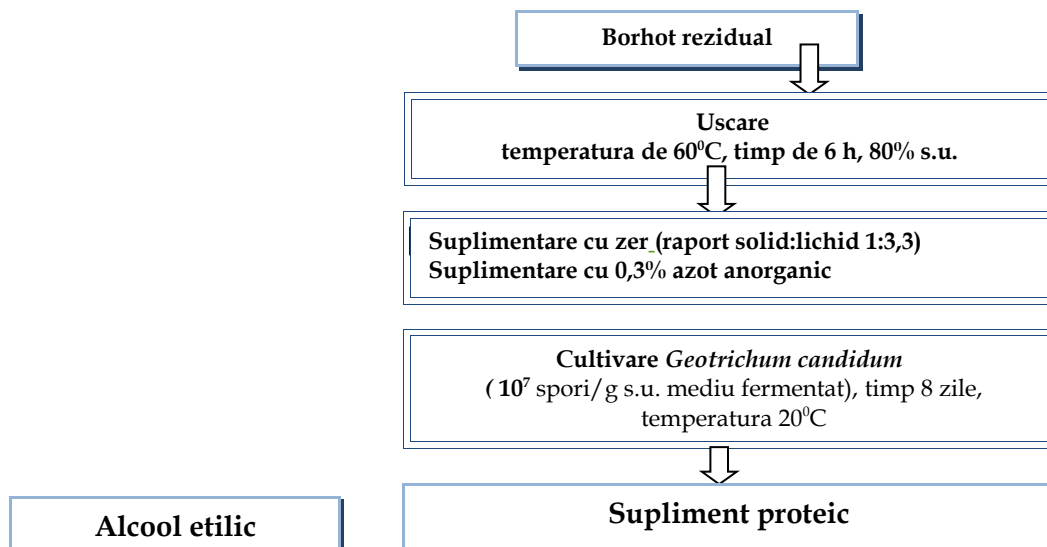
- S-a studiat posibilitatea biovalorificării deșeurilor din hârtie în vederea producerii de proteine microbiene (SCP, Single Cell Protein), prin fermentație în sistem SSF, utilizând tulpina selecționată *Geotrichum candidum* MIUG 2.15.
- S-a studiat potențialul de creștere a mucegaiului *Geotrichum candidum* MIUG 2.15 pe substrat celulozic brut derivat din hârtie reziduală (brut, pretratată sau borhot rezidual rezultat din procesul de bioconversie în bioetanol), suplimentat cu azot organic (zer) sau anorganic (îngrășământ complex, azotat de amoniu). S-a observat că mucegaiul *Geotrichum candidum* MIUG 2.15 se dezvoltă cel mai bine pe materialul celulozic îmbogățit cu zer și azotat de amoniu.
- Borhotul rezidual din fermentația alcoolică poate fi valorificat pentru producerea de biomasă fungică, în vederea conversiei celulozei reziduale și obținerii de suplimente furajere cu valoare nutritivă superioară.
- Prin modelare matematică și analiză statistică s-a studiat efectul a trei variabile independente, concentrației în azot anorganic, raportul solid/lichid și timpul de cultivare, în procesul de acumulare a biomasei și biosinteza a proteinelor fungice, prin cultivarea tulpinii selecționate *Geotrichum candidum* MIUG 2.15, în sistem SSF.
- Un randament superior de biosinteza a proteinelor se obține când concentrația în azot anorganic este 0,3%, este raportul solid/lichid de 1:3,3 și timpul de cultivare este 8 zile.

- Prin cultivarea mucegaiului *Geotrichum candidum* MIUG 2.1, pe substrat celulozic mixt derivat din hârtie și carton, în condițiile optimizate, specifice acestui studiu, se obține un grad superior de bioconversie a celulozei, cu scădere de la 65% (în mediul fermentativ) la 12% (în mediul rezidual).
- Produsul fermentat obținut, este substanțial îmbogățit în azot organic și este recomandat pentru utilizare ca aditiv furajer.

În urma studiilor efectuate s-a realizat o schemă bloc pe operații unitare pentru biovalorificarea deșeurilor celulozice din hârtie prin utilizarea enzimelor și a culturilor starter fungice.

Figura 22. Schema bloc pe operații unitare pentru biovalorificarea deșeurilor celulozice din hârtie prin utilizarea enzimelor și a culturilor starter fungice





Concluzii generale

Managementul deșeurilor, indiferent de natura lor, reprezintă o prioritate pentru identificarea de noi resurse regenerabile, pentru protecția mediului înconjurător și creșterea calității vieții. Materialele lignocelulozice reziduale reprezintă sursa cea mai importantă de deșeuri organice, care conțin o cantitate mare de carbon, din care prin bioconversie, prin diferite procedee fermentative se pot obține produse cu valoare economică (biocombustibili, bioaditivi, și bioingrediente, chimicale etc.).

Deșeurile urbane și menajere, derivate din hârtie reziduală, reprezintă surse importante de celuloză, din care se pot obține produse cu valoare economică.

Studiile realizate în teza de doctorat, care au vizat biovalorificarea deșeurilor celulozice derivate din hârtie au condus la următoarele concluzii generale:

- Pentru biodisponibilizarea celulozei din hârtie de scris, ziar sau carton s-au studiat diverse tratamente mecanice și fizico-chimice, aplicate individual sau combinat, care au constatat în măcinarea materialelor celulozice, tratamentul termic, tratamentul cu solvenți organici, sau cel chimic cu soluții de NaOH și H₂SO₄ în concentrații de 0,1; 0,5; 1; și 2%, la diferite temperaturi (temperatura mediului ambiant, 50°C, 75°C, 120°C, diferite intervale de timp: 1h, 2h, 24h, 48h, în etuvă sau în autoclav).
- Cea mai eficientă metodă s-a dovedit a fi pretratatamentul cu 2% H₂SO₄, realizat la 120°C, timp de 1 oră, în atmosferă umedă, la 1 atm.
- S-au studiat și optimizat condițiile biotehnologice de bioconversie a deșeurilor celulozice derivate din hârtie în etanol, urmând următoarele etape de studiu: analiza condițiilor de hidroliză enzimatică a materialelor celulozice pretratate, analiza și optimizarea condițiilor de conducere simultană a etapelor de hidroliză enzimatică și fermentație alcoolică. Prin analiza preliminară a principalilor factori care influențează procesul de bioconversie s-au stabilit:

- tulpina de drojdie cu cel mai bun randament de fermentație, o tulpină aparținând speciei *Saccharomyces cerevisiae*, codificată T2, din colecția de microorganisme a platformei de formare și cercetare Bioaliment;
 - utilizarea unui substrat celulozic mixt format din hârtie de scris, ziar și carton combinate în proporție de 1:1:1;
 - necesitatea echilibrării raportului C:N din compoziția mediului fermentativ, prin utilizarea de îngrășământ complex; conducerea simultană a hidrolizei enzimatică a substratului și a fermentației alcoolice, în următoarele condiții: temperatura = 32°C; pH-ul = 6.0; raport solid:lichid 1:15; timp 48 h.
- În aceste condiții randamentul în etanol obținut a fost de 4,3 kg din 100 kg material celulozic.
 - Prin modelare matematică (modelul Plackett-Burman și modelul compoziției centrale-metoda analizei suprafeței de răspuns) și analiză statistică (analiza ANOVA) s-a studiat și optimizat influența corelată a unor factori esențiali (variabile independente), asupra eficienței procesului de bioconversie (randamentul în etanol).
 - În urma acestor studii s-au stabilit factorii semnificativi care influențează procesul biotehnologic și anume: raportul solid:lichid; pH-ul; concentrația de enzima; concentrația de inocul; temperatura de fermentație. Condițiile optime pentru conducerea hidrolizei enzimatică sunt: concentrația de enzimă: 0,5 UE/g substrat celulozic; temperatura: 45°C ...48°C; pH-ul mediului de reacție: 4,5-4,8; adaosul de surfactanț, Tween 80 în concentrație de 0,3% în raportul cu volumul total al mediului de reacție; durata procesului 12 ore.
 - Condițiile optime pentru conducerea simultană a hidrolizei enzimatică și a fermentației alcoolice sunt: concentrația în substrat celulozic 20%; concentrația în azot 0,5%; concentrația de enzimă: 4 UE/g substrat celulozic mixt; concentrația de inocul: 10⁷ celule de drojdie/g substrat celulozic; raportul solid:lichid: 1:15. În aceste condiții s-a obținut un randament în etanol de 11,04 kg etanol/100 kg substrat celulozic mixt, pretratată. A fost studiată posibilitatea valorificării deșeurilor celulozice pentru producerea de proteine microbiene (SCP, *Single Cell Protein*), prin cultivarea tulpinii fungice selecționate *Geotrichum candidum* MIUG 2.15, pe substrat celulozic derivat din hârtie reziduală, material brut, material pretratată și borhot rezultat din procesul de producere a etanolului.
 - În condițiile biotehnologice testate, s-a demonstrat că acumularea de biomasă și biosinteză de proteine este influențată pozitiv de corecția conținutului de azot din mediu, prin adaos de zer sau azotat de amoniu.

- Aplicând metoda analizei suprafeței de răspuns, s-a examinat influența concentrației în azot, a raportului solid:lichid și a timpului de cultivare asupra procesului biotehnologic de obținere a proteinelor din deșeuri celulozice. Procesul de optimizare a fost realizat prin utilizarea ca substrat a materialului celulozic (hârtie ziar, hârtie de scris și carton, în proporție de 1:1:1) măcinat, netratat, amestecat cu zer și suplimentat cu azotat de amoniu, inoculat cu *Geotrichum candidum* MIUG 2.15.
- S-au stabilit parametrii optimi ai procesului de obținere a proteinelor din deșeuri celulozice și anume: concentrația în azot anorganic, 0,3%; raportul solid:lichid, 1:3,3; timp de cultivare de 8 zile. Prin cultivarea mușgaiului *Geotrichum candidum* MIUG 2.15, în sistem SSF (engl, *Solid State Fermentation*), pe substrat celulozic derivat din hârtie reziduală, suplimentat cu zer și azotat de amoniu, s-a obținut o valorificare superioară a celulozei din substrat, prin reducerea concentrației de celuloză de 5,5 ori comparativ cu concentrația din substratul inițial.
- Prin biosinteza de proteine, corelată cu reducerea conținutului de celuloză a substratului fermentat, se obține un aditiv furajer cu valoare nutritivă superioară.

Referințe bibliografice

Agaie E., Pazouki M., Hosseini M.R., Ranjbar M., Ghavipankeh F. (2009) Response surface methodology (RSM) analysis of organic acid production for kaolin beneficiation by *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Journal*, 147, p.245-251

Anghel I., Vamanu A., Mitache L., Popa O., Popa C., Stanciu C., Rozmarin G., Herczegh M., Arizan D., Cercel M., Arizan R. (1993) *Biologia și tehnologia drojdiilor*, volumul III, Editura Tehnică, București

Anupama P. R. (2000) Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, 18, p. 459-479

Andersen N., Johansen S. K., Michelsen M., Stenby H. E. , Krogh K., Olsson L. (2007) Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis orphosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel, *Enzyme and Microbial Technology*, 10, p. 1-0

Bahrim G. (2004) Agricultural biowaste as resources for fodder yeast additives development, *Roumanian Biotechnological Letters*, 4 (9), p. 1751-1756

Bahrim G., Nicolau A. (2002) *Biotehnologia preparatelor enzimatică – Tehnici și analize de laborator*, Editura Academica, Galați

- Bahrim G., Nicolau A. (2002) *Biotehnologia preparatelor enzimaticе*, Editura Academica, Galați
- Balat M., Balat H., Cahide O. (2007) Progress in bioethanol processing, *Progress in Energy and Combustion Science*, nr. 34, p. 1-23
- Banu C. (1987) *Biotehnologii în industria alimentară*, Editura Tehnică, București
- Banu C. (2006) *Bioalcoolul - combustibilul viitorului*, Editura Agir, București
- Borha V. (1988) *Alcoolul etilic carburant*, Editura Tehnică, București
- Champagne P., Li C. (2008) Bio-Product Recovery From Lignocellulosic Materials Derived From Poultry Manure. *Bulletin of Science Technology Society*, 28, 219, DOI: 10.1177/0270467607313955
- Currell B.R.C., Van Dam M. (1997) *Biotechnological Innovations in Chemical Synthesis*, Biotol Partners Staff © 1997
- Dan V. (2001) *Microbiologia alimentelor*, Editura Alma, Galați
- Dragotă D., Moisescu V. (2004) *Biocarburanți în România*, S. C. Chimiform Data S. A., București
- Dodic S., Popov S., Dodic J., et al. (2009) Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. *Biomass and bioenergy*, 33, p. 822 – 827
- Flickinger M., Drew S. (1999) *Encyclopedia of Bioprocess Technology- Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, Volumes 1-5, John Wiley & Sons
- Florea T. (2006) *Chimia alimentelor. Teorie și practică analitică*, Editura Academica, Galați
- García-Cubero T., González-Benito G. (2009) Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology*, 100, p. 1608–1613
- Georgescu L. A. (2003) *Enzimologie generală*, Editura Academica, Galați
- Gong C. S., Cao N. J., Tsao G. T. (1996) *Organic compounds, cellulose conversion*, Purdue University, West Lafayette, Indiana, p.65-83
- Ghose T. K. (1987) Measurement of cellulase activities, International Union of pure and applied chemistry applied chemistry division commission on biotechnology. *Pure & appl. chem.*, 59, p. 257 – 268

- Immanuel G. (2007) Production and Partial Purification of Cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* Fermented in Coir waste and Sawdust, *The Internet Journal of Microbiolog*, 1(3), p. 1-10
- Kaparaju P., Serrano M., Thomsen A., Kongjan P., Angelidaki I. (2009) Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 100, p. 2562–2568
- Kim K., Jung O., Shin H., Eom C., Kim W. (2008) Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochemistry*, 43, p. 1308–1312
- Matsushita Y., Inomata T., Hasegawa T., Fukushima K. (2009) Solubilization and functionalization of sulfuric acid lignin generated during bioethanol production from woody biomass. *Bioresource Technology*, 100, p. 1024–1026
- Mohanty S., Behera S., Swain M., Ray R. (2009) Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Applied Energy*, 86, p.640–644
- Moiser N., Wyma C, Dale B., Elander R., Lee Y.Y. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96, p. 673-686
- Popa O., Babeanu N., Vamanu A., Vamanu E. (2007) The utilization of the response surface methodology for the optimization of cultivation medium and growth parameters in the cultivation of the yeast strain *S. cerevisiae* 3.20 on ethanol *African Journal of Biotechnology*, 6, p. 2700-2707
- Popa V., Spiridon I., Anghel N. (2001) *Procese biotehnologice în industria alimentară*, Editura Media-Tech, Iași
- Rajesh R., Rajesh E., Rajendran R., Jeyachandran S. (2008) Production of bioethanol from cellulosic cotton waste through microbial extracellular enzymatic hydrolysis and fermentation. *Electronic journal of environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7, p.2984-2992
- Seema J. P. (2007) Study Of Ethanol Production From Fungal Pretreated Wheat And Rice Straw. *The Internet Journal of Microbiology*, 1, p. 4-10
- Segal R. (2006) *Biochimia produselor alimentare*, Editura Academica, Galați
- Scordia D., Cosentino S., Jeffries T. (2010) Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. ssp. *aegyptiacum* (Willd.) Hack. *Bioresource Technology*, nr. 36, p. 1-8, doi:10.1016/j.biortech.2010.02.036

Sun Y., Jiayang C. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. *Bioresource Technology*, 1, p.1-11

Tofan C., Bahrim G., Nicolau A., Zara M. (2004) *Microbiologia produselor alimentare - Tehnici și analize de laborator*, Editura Agir, București

Voca N. (2009) Progress in ethanol production from corn kernel by applying cooking pre-treatment, *Bioresource Technology*, 100, p.2712-2718

Zhang L., Champagne P., Xu C. (2010) Bio-crude production from secondary pulp/paper-mill sludge and waste newspaper via co-liquefaction in hot-compressed water. *Energy*, nr. 10, p. 1-9, doi:10.1016/j.energy.2010.05.029

Wang Y., Yuan H., Wang J. (2009) Truncation of the cellulase binding domain improved thermal stability of endo-beta-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* J A 18, *Biores. Tehnology*, 100, 345-349

Diseminarea rezultatelor cercetărilor

Rezultatele cercetărilor s-au materializat prin publicarea a **6 lucrări științifice**, dintre care **2 articole în curs de publicare cotate ISI** și 4 articole în reviste indexate în baze de date internaționale:

A. Articole cotate ISI

1. **Leuștean Iuliana**, Coman Gigi, Bahrim Gabriela, 2011, Optimisation of protein production by *Geotrichum candidum* MIUG 2.15 cultivated on paper residues, using response surface methodology. *Journal of Polymers and the Environment* (în recenzie)
2. **Leuștean Iuliana**, Coman Gigi, Bahrim Gabriela, 2010, Stastical optimisation of the bioethanol production from three cellulosic mixture based on residual paper. *Environmental Engineering and Management Journal* (in press)

B. Articole indexate în baze de date internaționale

1. **Leuștean Iuliana**, Georgescu Luminița, Bahrim Gabriela, 2011, Preliminary study for optimization of enzymatic hydrolysis of waste cellulosic materials. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI FOOD TECHNOLOGY*, 35 (1), ISSN 1843 - 5157, http://www.ann.ugal.ro/tpa/in_press.htm
2. **Leuștean Iuliana**, Coman Gigi, Bahrim Gabriela, 2010, The Plackett-Burman design of experiments model a enhancement alternative to indentify of the significant factors

implied in the complex cellulosic waste bioconversion in ethanol. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 7, 55-60, [www.bioaliment.ugal.ro/revista/7/paper 77.pdf](http://www.bioaliment.ugal.ro/revista/7/paper%2077.pdf)

3. **Leuștean Iuliana**, 2009, Bioethanol from lignocellulosic materials. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 15 (1), 94-100
4. **Leuștean Iuliana**, 2009, **Waste cellulose enzymatic hydrolysis kinetic**. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 15 (4), 561-563