

RST - RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC IN EXTENSO

ETAPA II: 2015

Obiectivele etapei

1. Dezvoltarea modelelor experimentale de obținere a catalizatorilor și a derivaților furanici esterificați. Experimentarea modelelor și dezvoltarea tehnologiilor la nivel de laborator.
2. Protejarea drepturilor de proprietate intelectuală la nivel național, diseminarea rezultatelor prin participări la conferințe și publicare de articole științifice.

În vederea atingerii obiectivelor celei de-a doua etape, activitățile au fost direcționate pe trei ținte principale:

1. Studiul posibilității obținerii hidroximetil furfuralului din melase prin dezvoltarea unor sisteme catalitice omogene / heterogene.
2. Studii preliminare a modelului și de dezvoltare a tehnologiei la scară de laborator pentru reacțiile de acetalizare, pentru conversia derivaților furanici intermediari
3. Elaborarea unor sisteme biocatalitice robuste pentru reacțiile de finale de obținere a biocombustibililor

I. REZUMATUL ETAPEI

1. S-au realizat investigații complexe privind obținerea hidroximetilen furfuralului în cataliza acidă omogenă și heterogenă, punându-se la punct metodele chimice de control ale procesului, parcurgându-se etapele de evaluare a performanțelor fiecărei variante studiate. Procesele au fost realizate la scară de laborator, culegându-se date suficiente pentru scale-up. S-a identificat varianta tehnologică optimă.
2. S-au realizat investigații complexe ale reacției de acetalizare a furfuralului, a 5-hidroximetilen furfuralului și a 5-metoximetilen furfuralului în verea obținerii gliceril acetalului furfuralului, 5-hidroximetilenfurfuralului și 5-metoximetilenfurfuralului. Aceste investigații efectuate la scară de laborator co.in date utilizabile la transpunerea la scară. Utilizarea reacției de acetalizare a derivaților furfuralului cu glicerina a fost realizată în scopul valorificării glicerinei – subprodus la alcooliza grăsimilor obținut odată cu biodieselul clasic și totodată pentru creșterea hidrofobicității conjugatilor formați.
3. S-a realizat un sistem biocatalitic insolubil, utilizat în premieră în producerea de biodiesel. Sistemul valorifică potențialul catalitic al lipazelor cu hidrofobitatea nanotuburilor de carbon, rezultatul fiind un produs care lucrează cu înaltă eficiență în condițiile unor limitări difuzionale extrem de reduse. Elaborarea și utilizarea sistemului a fost optimizată la nivelul principalilor factori de influență.

II. DESCRIEREA STIINTIFICA SI TEHNICA, CU PUNEREA IN EVIDENTA A REZULTATELOR ETAPEI SI GRADUL DE REALIZARE A OBIECTIVELOR

1. Studiul posibilității obținerii hidroximetil furfuralului din melase prin dezvoltarea unor sisteme catalitice hererogene

Conține două părți: dezvoltarea metodelor de analiză pentru monitorizarea conversiei materiei prime și studiul unor sisteme catalitice pentru sinteza HMF.

1.1. Dezvoltarea metodelor de analiză pentru monitorizarea conversiei materiei prime

În condițiile de lucru, melasa va hidroliza la un amestec de monoglucide (în particular glucoză și fructoză) care se vor deshidrata la hidroximetilen furfural. Plecând de la această premisă de lucru, s-a elaborat o metodă de analiză pentru caracterizarea materiei prime și a produșilor de reacție. Produsul principal de reacție este 5-hidroximetil-furfuralul, (HMF), care se găsește într-un amestec cu glucoza și fructoza nereacționate, precum și cu alți compuși prezenți în cantitate redusă care provin din melasă sau reprezintă produși de condensare ai HMF cu diferiți compuși aminici, hidroxilici prezenți.

Metodele de elecție au fost GC –MS, pentru caracterizarea fracției mai volatile ce conține HMF, iar pentru fracția ce conține monoglucidele și HMF a fost Cromatografia de înaltă performanță (HPLC).

Studiile preliminare au avut ca scop testarea unor diferite sisteme catalitice în procesul de conversie a fructozei, intermediarul model care se obține la hidroliza, deshidratarea melasei în cataliză acidă în pentru producerea de HMF

1.1.1. Elaborarea metodei de analiză HPLC pentru amestecurile de reacție care conțin fructoza și HMF

S-a utilizat un aparat HPLC JASCO echipat cu detector UV-VIS. Aparatul din dotare este echipat cu o pompa cuaternară. Pentru identificarea și cuantificarea HMF s-a folosit o coloana NUCLEOSIL C18, cu următoarele caracteristici: mărimea particulelor 5μm, lungimea coloanei 25cm, diametru 3.2mm, mărimea porilor 100Å. Faza mobilă a fost un amestec de ACN-apă demineralizată și soluție Buchler. Prin utilizarea soluției Buchler 100% s-a obținut o creștere a selectivității și sensibilității separării în condițiile optimizării timpului de analiză.

a) Determinarea concentrației de 5-hidroximetilfurfural

Nr. Stand.	II	III	IV	V
c (mg/ml)	0.75	0.5	0.25	0.125
A1 (mV)	397.3	271.1	131.1	69.1
A2 (mV)	396.5	272.0	133.7	69.3
A3 (mV)	397.1	271.3	133.6	69.1
A _{med}	396.67	271.43	132.8	69.17

Tabelul 1.1. Măsurători de calibrare cu soluții standard de HMF

S-a folosit ca eluent o soluție 100% Buchler. Parametrii folosiți: debit de eluent 1ml/min, lungime de undă 254nm, timp de analiză 15minute. Pentru analiză se prepara 5 soluții standard HMF cu concentrații diferite (vezi tabelul 1).

Timpul de retenție (RT) pentru HMF este de 11.5min (±0.5min). Diferențele dintre semnale la unele dintre analize sunt determinate de echipament.

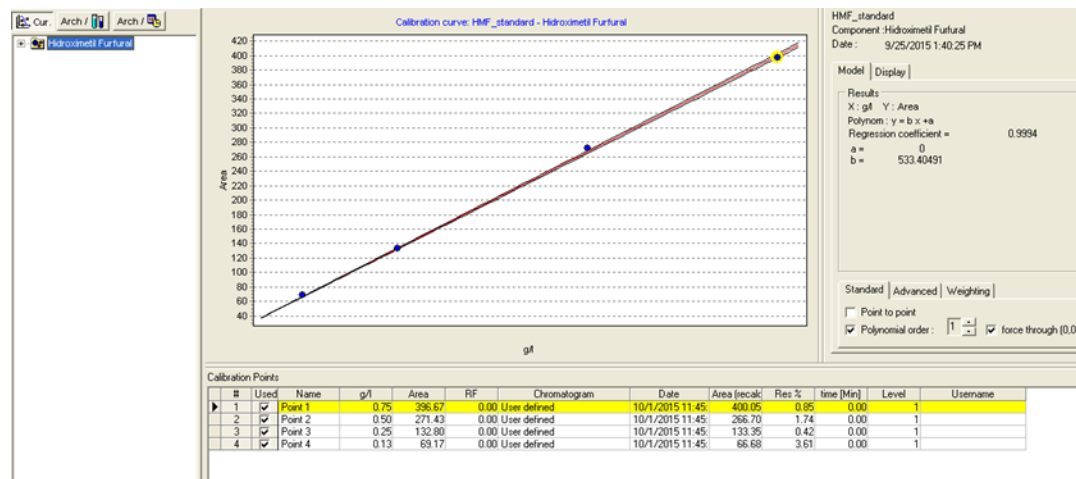


Fig.1.1 Curba de calibrare pentru HMF:

b) Determinarea concentrației de fructoză

# Stand.	I	II	III	IV
c (mg/ml)	10	5	2.5	1
A1 (mV)	30.8	15.4	7.5	3.4
A2 (mV)	31.0	16.3	7.9	3.4
A3 (mV)	31.3	16.2	8.0	3.4
A _{med}	31.03	15.97	7.8	3.4

Tabelul 1.2. Măsurători de calibrare cu soluții standard de fructoză

Carbhidrații pot fi cuantificați cu un detector UV la lungimi de unde mici, fără derivatizare; dezavantajul este metodei constă în zgomotul de fond care poate fi ridicat în acest domeniu. Totuși, cu aparatul din dotare cuantificarea carbohidraților s-a realizat cu o precizie de 95% pentru concentrații mai mari de 0.1 g/L. Pentru

analiza fructozei se folosește ca eluent soluția Buchler 100%. Parametrii folosiți: debit de eluent 1ml/min, lungimea de unda 195nm, timpul de analiza 10 minute. Pentru analiza se prepara 4 soluții de fructoză cu concentrații diferite. Identificarea fructozei s-a făcut pe baza timpului de retenție.

Din analiza datelor s-a obținut dreapta de calibrare:

Aria = 3.12325 x concentrația; coeficientul de regresie este $R^2 = 0.9995$

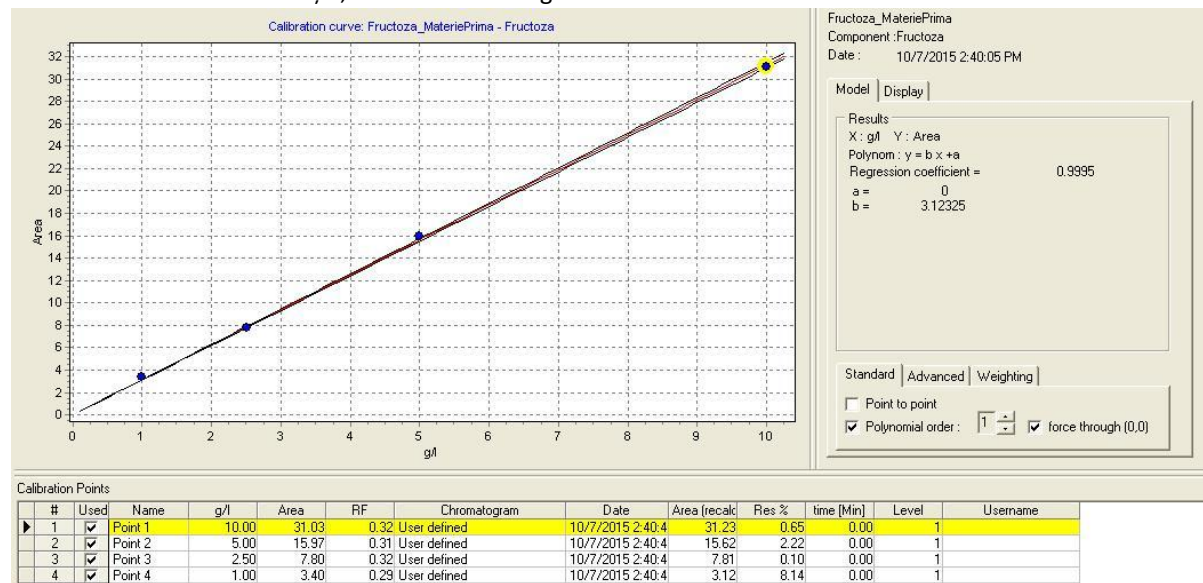


Fig.1.2.Curba de calibrare pentru fructoza

1.2. Studiul unor sisteme catalitice pentru sinteza HMF

Melasa hidrolizată acid conduce prin deshidratare tot în condiții acide la HMF. Faza de deshidratare poate fi realizată în cataliză omogenă sau heterogenă. Ambele sisteme prezintă avantaje cât și dezavantaje, astfel încât adoptarea variantei optime presupune o evaluare cât mai completă a ambelor variante. În cazul sistemelor omogene

1.2.1. Investigații privind obținerea HMF în sisteme catalitice omogene

Deshidratarea materiei prime se realizează cu minerali precum acidul sulfuric sau fosforic, în solvenți organici. Realizarea procesului în cataliză omogenă decurge în prezența unor acizi minerali tari, precum acidul sulfuric și acidul fosforic. Materia primă utilizată în această fază a fost fructoza, intermediarul model rezultat la hidroliza melasei în prezența aceluiași catalizatori. Metoda permite determinarea directă a conversiei materiei prime prin analize HPLC. După optimizarea procesului se va trece la testarea materiei prime, respectiv a melasei.

Aparatura de lucru

Sinteza HMF s-a realizat într-un reactor cu manta din sticlă, cu un volum de 500ml, prevăzut cu capac de sticlă cu patru găuri pentru refrigerent, termometru, agitator și pâlnie de picurare. Încălzirea amestecului reactant s-a realizat cu ajutorul unei calote prevăzute cu sistem de reglare a temperaturii.

Modul de lucru

Se introduc în reactor 150-200 ml solvent și 3-5% g fructoză. Se pornește agitarea și se încălzește amestecul la 65-80°C. După ce s-a atins temperatura prevăzută, se introduce catalizatorul prin picurare timp de 3 minute. Se agită timp de 1h, după care masa de reacție se răcește la temperatura camerei și se filtrează. Neutralizarea catalizatorului și recuperarea fazei organice s-a realizat diferit în funcție de natura solventului.

Program experimental

Parametrii testați în cadrul programului experimental au fost: natura solventului, tipul și concentrația catalizatorului. Solvenții folosiți în experiment au fost iZopropanol, tetrahidrofuran, isobutanol și toluen. Catalizatorii utilizați la realizarea sintezei au fost: acidul sulfuric și acidul fosforic.

A. Acidul utilizat la deshidratare: acidul sulfuric 97%

Prelucrarea masei de reacție în funcție de tipul solventului testat este prezentată mai jos:

Varianta 1: izopropanol

Se neutralizează cu soluție de 1M de NaHCO₃, după care se adăugă soluție saturată de NaCl pentru exprimarea fazei organice care conține HMF. Separarea fazei organice de faza apoasă s-a realizat cu o pâlnie de separare. Recuperarea completă a fazei organice din cea apoasă s-a realizat prin extracție succesivă în trei etape cu izopropanol. Îndepărtarea solventului din faza organică s-a realizat prin distilare cu un rotavaporator la două presiuni. În prima etapă, s-a îndepărtat izopropanolul ca azeotrop cu apa la presiunea de 230 mbar iar a doua etapă s-a îndepărtat restul de apă prezentă în faza organică la 77 mbar. În blazul de distilare se introduce acetona pentru îndepărtarea fructozei nereacționate și a sărurilor minerale (solubilitatea în acetona a fructozei și a sărurilor este mică). Suspensia acetonică se filtrează și apoi se evaporă acetona.

Variantele 2, 3: tetrahidrofuran (THF), izobutanol

Masa se neutralizează cu soluție de 1M de NaHCO₃ și se filtrează. Îndepărtarea solventului din faza organică s-a realizat prin distilare la rotavaporator (în prima etapă distilă THF, după care apa). Ca și în cazul precedent în blazul de distilare se introduce acetona, apoi amestecul rezultat se filtrează iar acetona se distilă. Metoda se aplică și atunci când solventul este izobutanolul.

Varianta 4: toluenul

D-fructoza se dizolvă în apă. Faza organică formată în reacție este extrasă din faza apoasă în toluen. Recuperarea fazei organice din toluen se realizează prin distilare la rotavapor. Aceasta variantă prezintă avantajul că acidul nu trebuie neutralizat, dar are și dezavantajul că se formează într-o proporție mai mare substanțe secundare, multe condensate care îngreunează filtrarea.

Influența naturii și concentrației catalizatorului

Influența concentrației catalizatorului a fost studiată în cazul utilizării acidului sulfuric. Studiul procesului a fost realizat la trei rapoarte molare acid sulfuric / fructoza: 3.38/1, 2.53/1, 1/1. La raportul molar acid sulfuric / fructoza de 3.38/1 se observă o conversie a fructozei mai mare decât la valori mai mici ale raportului molar. Mediul puternic acid prezintă dezavantajul favorizării reacțiilor de eterificare a hidroximetilfurfuralului atunci când solventul folosit este izopropanolul cu formarea izopropoxi-metilfurfuralului. Înlocuirea solventului pentru eliminarea acestui dezavantaj (tetrahidrofuran, toluen și izobutanol) generează alte dezavantaje. Astfel în cazul utilizării tetrahidrofuranului și a toluenului, fructoza prezintă o solubilitate redusă, iar folosirea unui cosolvent în care D-fructoza se dizolvă precum apa, favorizează formarea altor produse secundare o reacție notabilă fiind degradarea HMF în acid levulinic și acid formic.

Compoziția fazei organice în cazul sintezei realizate în prezența acidului sulfuric la un raport molar acid sulfuric / fructoza de 3.38/1 este prezentată în figurile 1.3-1.5. Se observă din analiza GC-MS/MS că compușii volatili sunt: 5-hidroximetilfurfural, 5-propoximetilfurfural și un produs necunoscut. Din evaluarea HPLC (Fig 1.5) se poate cuantifica concentrația HMF, se poate calcula selectivitatea reacției la HMF de 30% și conversia totală a fructozei.

Peak Number	RT	Area	Area %	Height	Area Sum %
1	5.235	343048	14.59	138773	9.33
2	7.333	2351573	100	584893	63.99
3	8.108	980316	41.69	362232	26.68

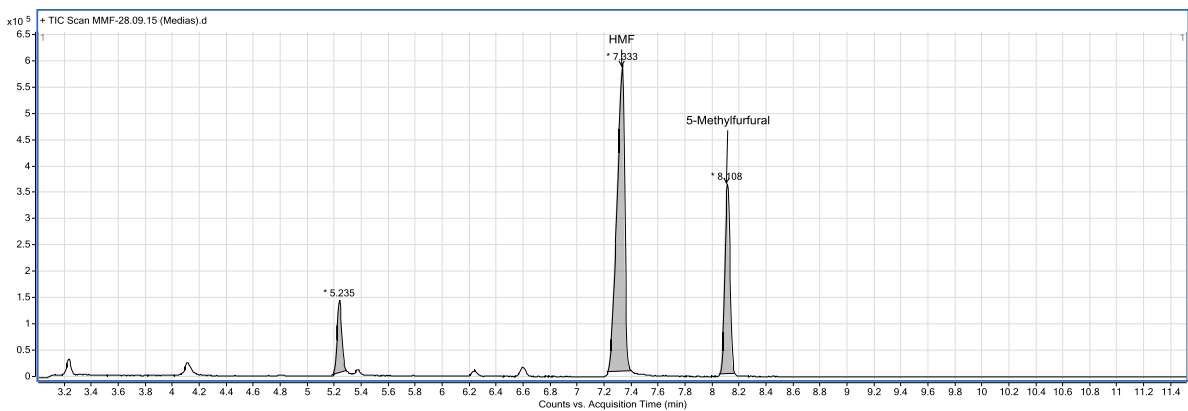


Fig.1.3. Analiza GC-MS/MS probei de deshidratare acidă a fructozei HMF la

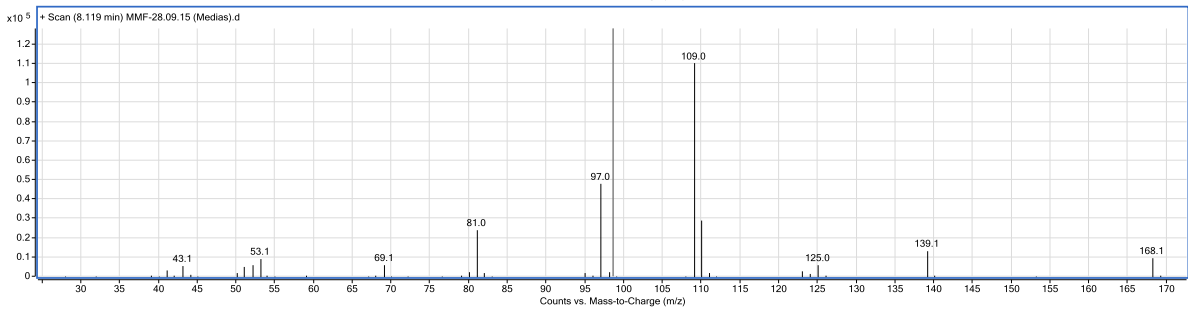
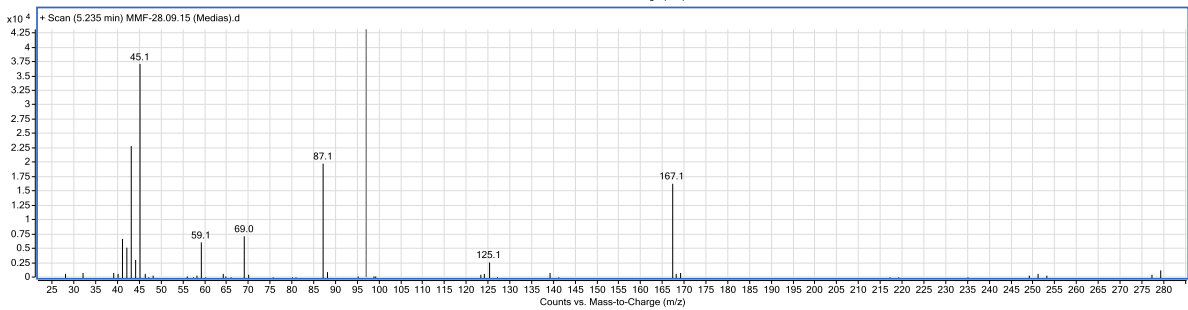
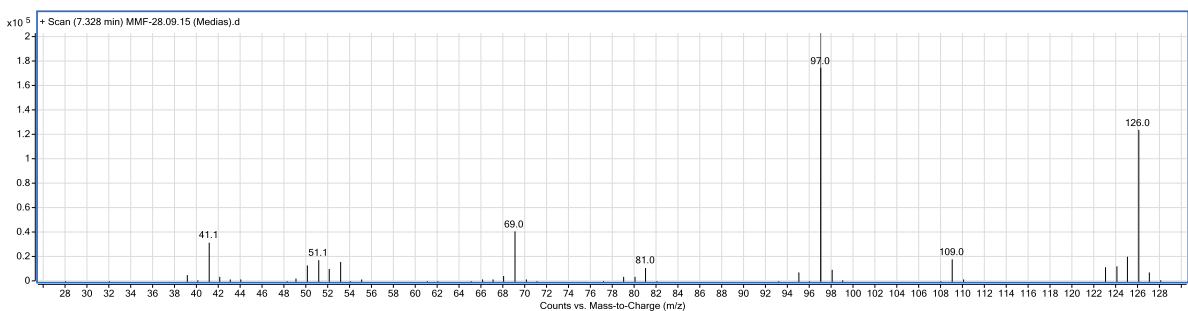


Fig.1.4. Spectrele de masă ale fracțiilor separate la GC (fig.3) la RT=5.235(necunoscut), RT=7.33 (HMF) și RT=8.1(propoximetilfurfural, PMF)

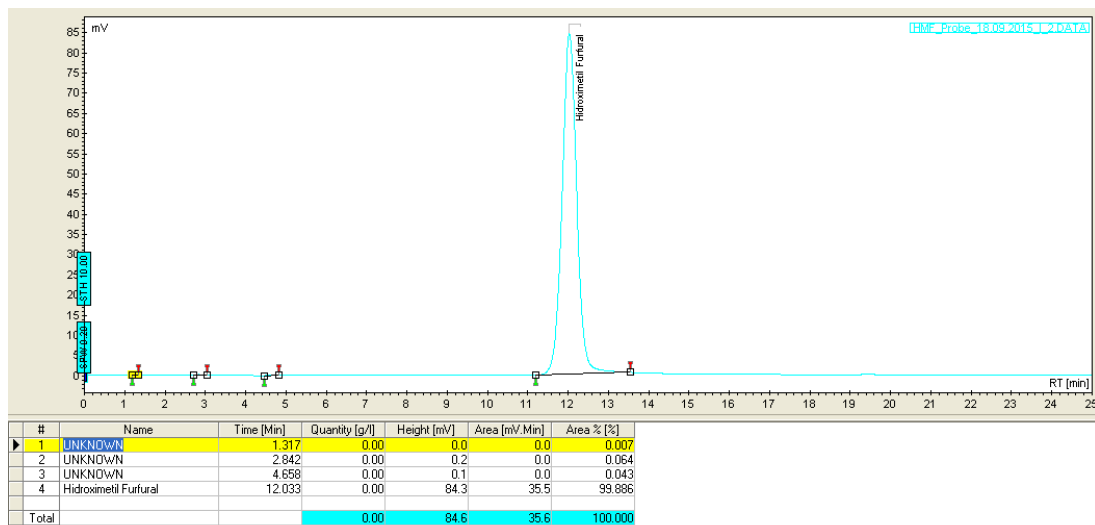


Fig. 1.5 Cromatograma HPLC a amestecului de reacție de la deshidratarea acida a fructozei

B. Acidul utilizat la deshidratare: acidul fosforic

Pentru realizarea procesului de sinteza a HMF în prezența acidului fosforic s-a utilizat isobutanolul ca solvent, având în vedere reactivitatea ridicată a isopropanolului în reacția de eterificare cu HMF. Procesul s-a realizat la un raport molar acid fosforic / fructoza de 1:1, pe o durată de maxim 4 ore. Conversia maximă a fructozei de 57.33%, s-a atins după 4 ore iar selectivitatea la HMF a fost de numai 1%.

1.2.2. Investigații privind obținerea HMG în sisteme catalitice heterogene

Aceste sisteme au avantajul, ca necesită un număr redus de operațiuni unitare, recuperarea catalizatorului este mai ușoară (decurge de obicei numai printr-o simplă filtrare/ centrifugare). Principalele dezavantaje constau în prețul mare al catalizatorilor și cheltuielile de cercetare pentru optimizarea rețelei catalitice. Optimizarea rețelei catalitice presupune elaborarea unei tehnologii ieftine de regenerare a catalizatorului, de obținere a unui catalizator cât mai stabil și finalmente, pentru o producție dată, o influență minimă a catalizatorului în costurile investiționale și de operare. Catalizatorii solizi recomandați în astfel de procese sunt fie acizi minerali depuși pe suporturi catalitice de tip silice mezoporoasă (SBA15, MCM-41), cărbune activ, sau γ -alumină, funcționalizate, fie cationiți (Dowex, Amberlyst, etc). Preocupările sunt orientate spre obținerea de catalizatori cu tarie acida optimă pentru deshidratarea selectivă a D-fructozei la 5-hidroximetilfurfural.

1.2.2.1. Catalizatori de tip fosfowolframici

Au fost testați catalizatori pe baza de acid fosfowolframic depus pe două suporturi de silice mezoporoasă: SBA-15 și MCM-41. S-a realizat o investigație exploratorie cu cei doi catalizatori și cele două suporturi

a. Catalizatorul care conține 40% acid fosfowolframic pe MCM-41 (40PW/MCM-41).

Parametrii de operare: Raportul masic D-fructoza / catalizator: 5/1; Temperatura de lucru: 120°C. Solvent: dimetilformamida (DMF)

Modul de lucru

Se introduce în reactor 100 ml DMF și 3 g fructoza. Se porneste agitarea și se încălzește amestecul la 120°C. După ce s-a atins temperatura de lucru se introduce 0.6 g catalizator 40PW/MCM-41. Suspensia se agită timp de 4h, după care se răcește la temperatura camerei, final catalizatorul îndepărtându-se prin filtrare. Se ia 1ml de proba pentru analiză în fiecare oră. Faza lichidă a masei de reacție s-a analizat prin metoda HPLC. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3. Conversia fructozei a fost de 25.3% la un timp de reacție de 60 minute și 41.67% după 240 minute de reacție. Selectivitatea la HMF a fost de 2.05% la un timp de reacție de 60 minute și scade până la 1.26%

după 240 minute. Din analiza GC-MS/MS se observă că un compus chimic cu o masă moleculară de 252 probabil un dimer al HMF (fig.1.7).

Tabelul 1.3. Rezultate ale conversiei fructozei la HMF cu catalizatorul 40PW/MCM-41					
t (min)	Fructoza în proba (g)	Fructoza convertită	HMF în proba (g)	Conversie fructoza,%	Selectivitate la HMF,%
60	2.241	0.759	0.0109	25.3	2.05
240	1.75	1.25	0.0111	41.67	1.26

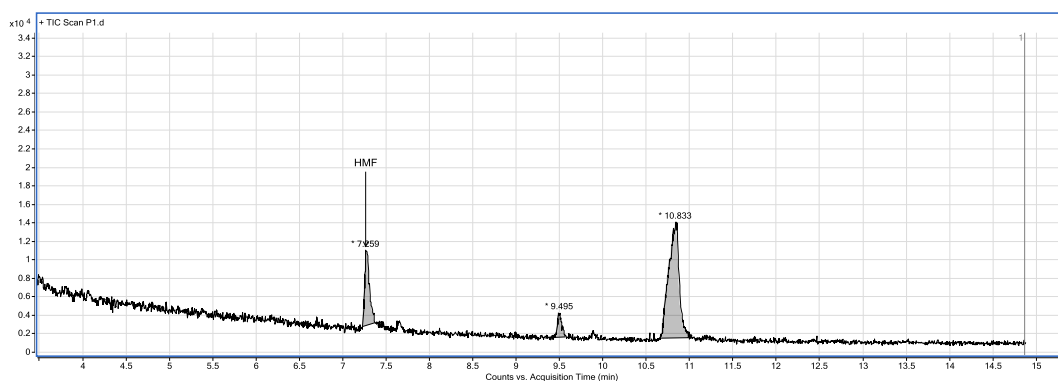


Fig 6. Cromatograma GC-MS/MS din proba conversiei fructozei la HMF cu 40PW/MS1, după 240 min.

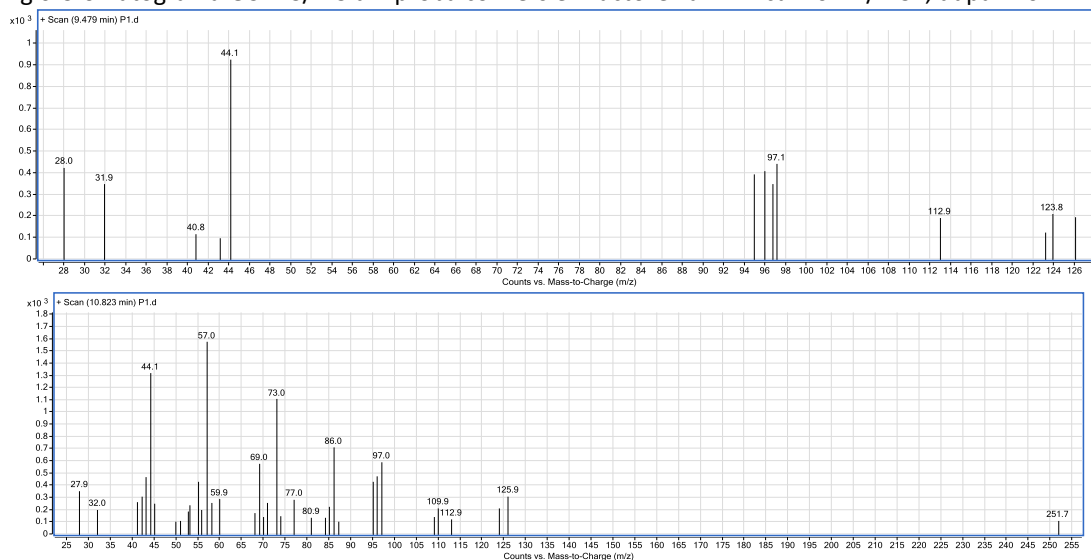


Fig7. Spectrul de masa a probelor 40PW/MS1, după 240 min.

b. Catalizatorul care contine 30% acid fosfowolframic pe silice mezoporoasa SBA15 (30PW/SBA15)

Parametrii de operare: Raportul masic D-fructoza / catalizator: 5/1; Temperatura de reacție: 90°C; Solvent: DMF

Modul de lucru

Se introduc in reactor 70 ml dimetilformamida (solvent) si 2.1 g fructoza. Se porneste agitarea si se incalzeste amestecul la 90°C. Dupa ce s-a atins temperatura prevazuta se introduce 0.4g 30PW/SBA15. Se agitã timp de 4h, și după răcire la temperatura camerei se filtreaza catalizatorul. S-au prelevat pentru analiză câte 1ml de probă în fiecare ora. Deshidratarea fructozei la HMF s-a studiat la temperatura de 90°C in prezenta solventului dimetilformamida. Conversia fructozei la un timp de reactie de 420 minute a fost de 23.56% iar selectivitatea la HMF a fost de 3.56%.

Se observă că in cazul catalizatorilor superacizi de tip acid fosfowolframic depus pe cele două tipuri de silice mezoporoase la concentrații de 30% și respectiv 40% s-au obtinut performante scăzute. Astfel, pentru condițiile de operare selectate, s-au obținut de către noi conversii ale fructozei de maxim 40% după 240 minute iar

selectivitatea maximă la HMF a fost de 3.5% și scade odată cu creșterea timpului de contact. Ridicarea temperaturii de la 90°C la 120°C a dus la scăderea selectivității de la 3.5% la 2% la o conversie a fructozei constantă de 40%. Selectivitatea scăzută, este atribuită transformării HMG în condițiile de reacție date.

Plecând de aici, deshidratarea fructozei trebuie făcută pe catalizatori cu o aciditate mai redusă, respectiv pe cationiți, la temperaturi de reacție 80-150°C în funcție de solventul folosit. În literatură se regăsesc catalizatori pe de tip rășini schimbatoare de ioni funcționalizate cu grupări sulfonice, care au condus la obținerea unor conversii de 70-90% și valori ale selectivității de 80-90%. De exemplu cu cationitul Amberlyst 15, în prezența solventului N,N-dimetilformamida, s-au obținut conversii ale fructozei de până la 75% cu selectivități la HMF de 90-98%. Cationiții catalitici solizi se separa ușor de masa de reacție prin filtrare. Prin acesta se facilitează atât reutilizarea lor, după o prealabilă regenerare cât și transpunerea procesului la o scară mai mare.

I.2.2.2. Catalizatori de tip cationit – Amberlyst - 15

Protocol de lucru de principiu:

Pentru obținerea 5-hidroximetilfurfuralului s-au selectat solvenți polari, cu punct de fierbere relativ ridicat în jurul valorilor 110-160°C (ex. DMF, DMA, n-butanol, DMSO). Solventul se încălzește la temperatura de 80-120°C, după care se va adăuga fructoza în proporție de 2-10%. După dizolvarea D-fructozei se adăuga catalizatorul la un raport masic catalizator / fructoza de 0.5-2 / 1 (g/g). După o agitare timp de 1-8 ore, suspensia se va filtra, pentru separarea catalizatorului după răcirea masei de reacție la temperatura camerei. Solventul îndepărtează prin distilare în vid.

Protocolul pus în operă a utilizat pentru deshidratarea fructozei la HMF catalizatorul Amberlyst 15 partial gonflat, un catalizator mezoporos cu dimensiunea mezopozilor relativ mică. Astfel, într-un reactor de 500 ml cu manta din sticlă, prevăzut cu capac de sticlă cu patru găuri pentru refrigerent, termometru, agitator și pâlnie de picurare, s-au introdus 100 ml DMF și 3 g fructoza. S-a pornit agitarea și s-a încălzit la 90°C. După dizolvarea fructozei s-au adăugat 2 g Amberlyst 15 (raport masic rășina/fructoza de 2/3). S-au luat probe la fiecare 30 min pentru analize. După 5h masa de reacție s-a răcit la temperatura camerei și s-a filtrat catalizatorul. Se îndepărtează la vid solventul, obținându-se un produs portocaliu. Masa catalizatorului recuperat, respectiv 1.72 g cationit, evidențiază reducerea gradului de gonflare a rășinii (pierderea de fază lichidă din pori).

Probele au fost analizate prin metoda cromatografică HPLC. S-a folosit un debit de 1ml/min, eluent 100% soluție Buchler. S-a setat lungimea de undă la detectorul UV-VIS la 195 nm (pentru evidențierea fructozei). După exact 3 min și 30 sec. Lungimea de undă se schimbă la 254 nm în vederea evaluării HMF. În vederea realizării analizelor cantitative s-au folosit curbe de calibrare atât pentru fructoza cât și pentru HMF. Produsele secundare nu au fost identificate.

Relațiile folosite pentru determinarea performanțelor proceselor sunt:

$$\text{Conversia fructozei} = (\text{Fructoza convertită} / \text{Fructoza inițială}) * 100$$

$$\text{Selectivitatea la HMF} = [(HMF * M_{\text{fructoză}} / M_{HMF}) / \text{Fructoza convertită}] * 100$$

t (min)	Fructoza în proba (g)	Fructoza convertită(g)	HMF în proba (g)	Conversia fructozei (%)	Selectivitate la HMF (%)
30	2.305	0.695	0.289	23.16	59.35
60	2.017	0.983	0.549	32.76	79.72
120	1.440	1.560	0.869	52.00	79.51
150	1.409	1.591	1.056	53.03	95.07
210	1.095	1.905	1.291	63.50	96.73
270	0.940	2.060	1.380	68.66	95.62
300	0.768	2.232	1.481	74.40	94.71

Tabelul 1.5. Performanțele catalizatorului Amberlyst 15 pentru conversia fructozei la HMF (D-fructoza/catalizator=3/2 –g/g)

În condițiile de lucru se observă o creștere în timp a conversiei. Selectivitatea înregistrează un maxim, neatins cu alte tipuri de catalizatori. Selectivitatea, remarcabilă înregistrează un maxim de 96,73% la 210 min de asemenea remarcabil. Ridicând ponderea catalizatorului, în amestecul inițial datele prezentate în tabelul 6 atestă atât creșterea conversiei cât și a selectivității, la 300 min ajungându-se la o conversie de 76,52% respectiv la o selectivitate practic absolută.

t (min)	Fructoza în proba (g)	Fructoza convertită(g)	HMF în proba (g)	Conversia fructozei, %	Selectivitate la HMF, %
60	1.395	0.705	0.490	33.57	99.21
120	0.993	1.107	0.770	52.71	99.28
180	0.717	1.383	0.946	65.85	97.63
240	0.538	1.562	1.066	74.38	97.41
300	0.493	1.607	1.125	76.52	99.92

Tabelul 1.6. Performanțele catalizatorului Amberlyst 15 pentru conversia fructozei la HMG (D-fructoza/catalizator=1/1 –g/g)

Pentru evaluarea influenței reutilizării catalizatorului, acesta s-a folosit într-un proces succesiv, fără o condiționare specială.

Protocolul experimental a fost similar celui cu exces de fructoză: în 86ml DMF s-a dizolvat 2.58g fructoza. După atingerea temperaturii de 90°C după care se adaugă 1.72 g Amberlyst15 recuperat din sarja anterioară. Sistemul se menține sub agitare timp de 5h, în fiecare oră prelevându-se probe pentru analize. La finele perioadei după, răcirea masei la temperatura camerei, s-a filtrat catalizatorul, îndepărtându-se prin distilare solventul. A fost obținut un lichid portocaliu, vâscos.

t (min)	Fructoza în proba, (g)	Fructoza convertita, (g)	HMF in proba, (g)	Conversia fructozei, %	Selectivitatea la HMF, %
60	1.445	1.135	0.491	43.99	61.75
120	1.074	1.506	0.811	58.37	76.86
180	0.925	1.655	0.903	64.14	77.88
240	0.853	1.727	1.006	66.93	83.15
300	0.798	1.782	1.098	69.06	87.95

Tabelul 1.6. Performanțele catalizatorului Amberlyst 15 recuperat pentru conversia fructozei la HMG (D-fructoza/catalizator=3/2 – g/g)

Se observă că performanțele sunt similare ușor superioare în cazul utilizării catalizatorului proaspăt.

2. Studii preliminare a modelului și de dezvoltare a tehnologiei la scară de laborator pentru reacțiile de acetalizare, pentru conversia derivaților furanici intermediari

2.1. Prezentare generală

O alternativă de valorificare superioară a glicerinei brute rezultate ca produs secundar la fabricarea biodieselului, este prin transformarea chimică a acesteia, în componenți oxigenați pentru carburanți. Glicerina are o structură polară și nu poate fi utilizată ca atare drept component pentru carburanți, fiind complet insolubilă în aceștia. Prin transformarea glicerinei în acetali se mărește solubilitatea în carburanți. În plus, acetali pot îmbunătăți caracteristicile carburanților clasici, în special cele legate de cantitatea de noxe din gazele de eșapament, deoarece acetali glicerinei au un conținut ridicat de oxigen în structură, contribuind astfel la îmbunătățirea combustiei.

5-Hidroximetilfurfuralul (HMF) având o structură versatilă, este un intermediar important pentru numeroși compuși cu valoare de utilizare ridicată. HMF se poate obține prin deshidratarea unor monoglucide provenite din zaharoză, melase, amidon sau celuloza componentă a biomasei lignocelulozice.

Condensarea glicerinei cu aldehidele conduce de obicei la formarea unui amestec complex de izomeri cu structură de 1,3-dioxacilani disubstituiți, având heterocicluri de 5 și 6 atomi, după cum are loc reacția grupei carbonil cu grupele hidroxil din pozițiile 1,2 sau 1,3 din structura glicerinei. Se obțin astfel amestecuri de diastereomeri de tip 4-hidroximetil-1,3-dioxolani 2-substituiți și 5-hidroxi-1,3-dioxani.

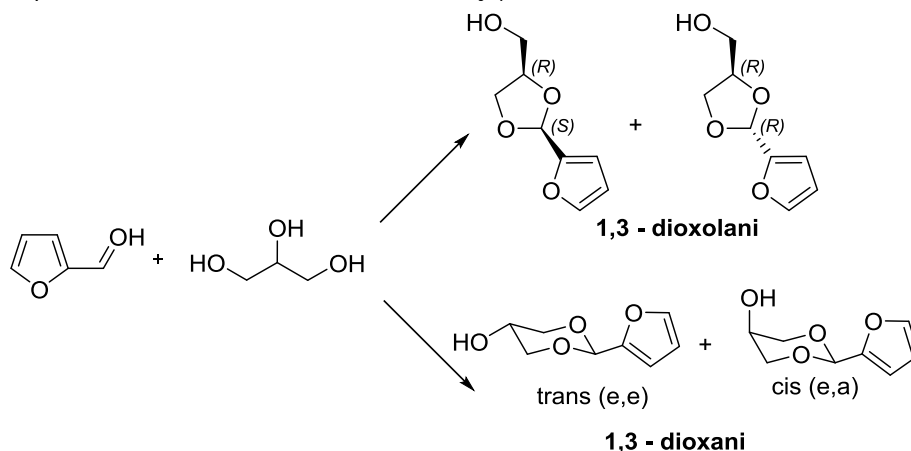


Fig.2.1 Producții de condensare ai furfuralului cu glicerina

Studiile preliminare vizând modelul bazat pe reacțiile de acetalizare ale glicerinei au fost focalizate asupra condensării furfuralului cu glicerina. Experimentările au fost continuate în direcția acetalizării 5-hidroximetilfurfuralului și a derivatului său substituit, 5-metoximetilfurfuralul (MMF).

Sinteza și caracterizarea furfuraliden glicerolului a oferit informații utile pentru continuarea cercetărilor privind condensarea cu glicerina a derivatilor 5-substituiți ai furfuralului, despre care nu există informații în literatura de specialitate.

2.2. Sinteza gliceril acetalului furfuralului

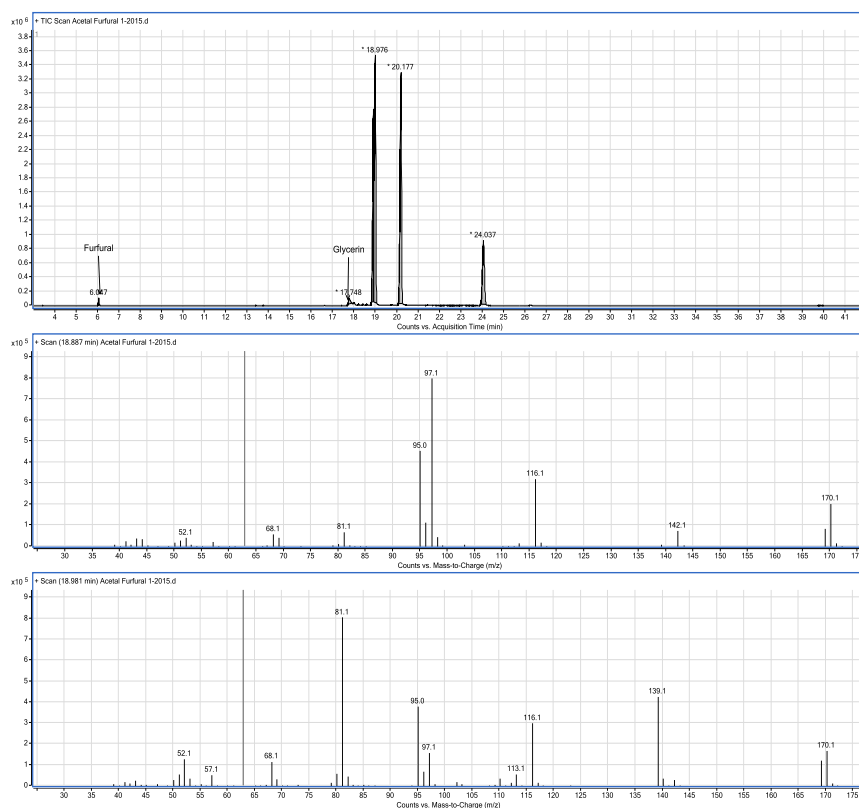
2.2.1 Prezentare generală

Gliceril acetalul furan-2-carbaldehidei (furfuralului) s-a obținut prin condensarea glicerinei cu furfuralul în cataliza acidă, sub forma stereoizomerilor conform ecuației din figura 2.1

S-au utilizat catalizatori acizi heterogeni. Deplasarea favorabilă a echilibrului reacției s-a realizat prin îndepărtarea apei din sistem, prin distilare azeotropică, utilizând drept solvenți toluenul și benzenul. S-a utilizat un exces mic de furfural, față de necesarul stoichiometric. Rezultă un amestec de 6 izomeri, respectiv 2 izomeri cis- și trans-2-(2-furil)-5-hidroxi-1,3-dioxan, precum și și 4 diastereomeri sub forma a două perechi de enantiomeri (R,R) - (S,S) și (R,S) - (S,R) ai 2-(2-furil)-4-hidroximetil-1,3-dioxolanului.

2.2.2 Caracterizare analitică

Pentru analize s-a utilizat un cromatograf Agilent Technology 7890A GC MS/MS Triple Quad. În Fig. 2. se prezintă cromatograma gliceril acetalului furan-2-carbaldehidei. La timpii de retenție 18,892; 18,976; 20,177 și 24,037 se prezintă 4 din cei 6 izomeri componenți, fiecare având concentrațiile cf. tabelului anexat. Nu s-a făcut atribuirea semnalelor pe structurile structurilor detectate.



Peak Number	RT	Area Sum %
1	6.047	0.63
2	17.748	1.39
3	18.892	24.98
4	18.976	27.79
5	20.177	32.67
6	24.037	12.54

Fig.2.2. Cromatograma gliceril acetalului furan-2-carbaldehidei

2.3. Sinteza glicerilacetalului 5-hidroximetilfurfuralului

Sinteza gliceril acetalului 5-hidroximetilfurfuralului s-a realizat prin condensarea glicerinei cu 5-hidroximetilfurfural. S-au utilizat următorii solvenți: xilen, cloroform și 1,4-dioxan. Drept catalizatori s-au utilizat derivați polimerici acizi macroporoși de tip PUROLITE CT 275, de tip AMBERLYST 15, și catalizatori superacizi de tipul acidului tungstosforic depus pe silice mezoporoasă. S-au obținut produse cu numeroase impurități. Grupa hidroxilică din structura 5-hidroximetilfurfuralului este foarte reactivă, fiind în "poziție alilică" și participă la numeroase reacții nedorite. În plus, acetalul care se formează conține 2 grupe hidroxil ceea ce determină o insolubilitate totală în hidrocarburile componente ale motorinei.

În aceste condiții, s-a recurs la blocarea grupei hidroxilice prin metilare, rezultând 5-metoxi-metilfurfural. În continuare se va prezenta tehnologia de obținere a gliceril acetalului 5-metoximetil-furfuralului.

2.4. Sinteza gliceril acetalului 5-metoximetilfurfuralului

2.4.1 Prezentare generala

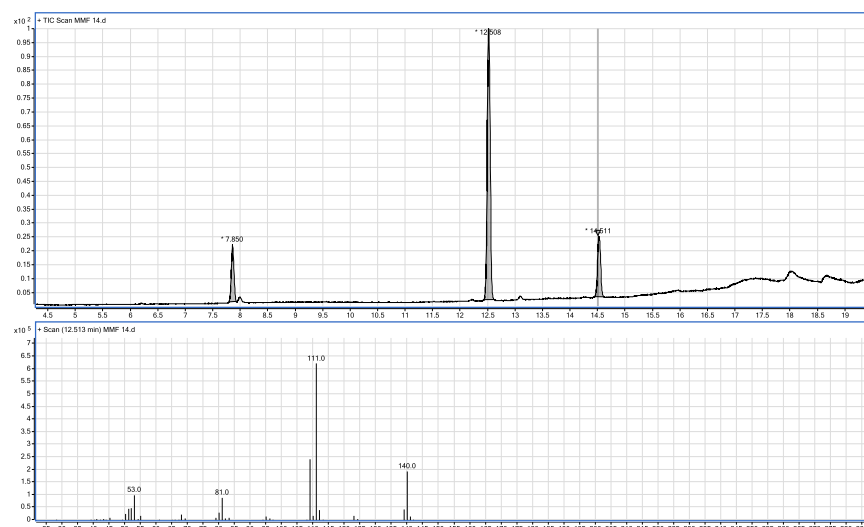
Sinteza gliceril acetalului 5-metoximetilfurfuralului s-a realizat prin condensarea glicerinei cu 5-metoximetilfurfural. Acesta a fost obținut în cadrul experimentarilor de laborator, prin modificarea sintezei 5-hidroximetilfurfuralului, în sensul realizării metilării in situ a acestuia, în prezența metanolului. Astfel, sinteza s-a realizat prin deshidratarea fructozei în cataliză puternic acidă, simultan cu reacția cu metanolului. Au fost utilizați numeroși solvenți, solventul preferat fiind cloroformul. Reacția de bază la sinteza gliceril acetalului 5-metoximetilfurfuralului este similara celei de la sinteza gliceril acetalului furan-2-carbaldehidei, prezentate în Fig. 1. În studiile preliminare s-au testat numeroși catalizatori acizi heterogeni, selectându-se 2 catalizatori. Deplasarea favorabilă a echilibrului reacției s-a realizat prin îndepărtarea apei din sistem, prin distilare azeotropică, utilizând în studiile preliminare mai mulți solvenți. S-a preferat cloroformul. Reactanții au fost utilizați în raport stoichiometric. Final rezultă un amestec de 4 izomeri, respectiv 2 izomeri cis- și trans-2-(2-metoximetilfural)-5-

hidroxi-1,3-dioxan, similari cu cei prezentați în Fig 2.1, în conformație "scaun" și 2 izomeri cis- și trans-2-(2-metoximetilfuralil)-4-hidroximetil-1,3-dioxolan, similar cu cei prezentați în Fig 2.1.

2.4.2. 5-Metoximetilfurfuralul

A fost sintetizat în cadrul lucrărilor de laborator, utilizând metoda de sinteză a 5-hidroximetilfurfuralului, modificată corespunzător. S-a deshidratat fructoza în prezența HCl 37%, a metanolului, a unui co-catalizator heterogen puternic acid, cu structură polimerică macroporoasă de tip PUROLITE CT 275 și a cloroformului ca solvent. 5-Metoximetilfurfuralul format s-a extras în cloroform. Masa de reacție a fost filtrată pentru îndepărtarea catalizatorului, iar filtratul a fost decantat. Soluția cloroformică a 5-metoximetilfurfuralului a fost spălată cu apă, iar cloroformul s-a îndepărtat prin distilare.

În Fig. 2.3 se prezintă cromatograma 5-metoximetilfurfuralului.



Peak Number	RT	Area Sum %
1	7.85	13.38
2	12.508	70.08
3	14.511	16.54

Primul semnal este atribuit levulinatului de metil, compus care însoțește întotdeauna 5-metoximetil-furfuralul, rezultat fiind din descompunerea termică a acestuia. Următorul este 5-metoximetilfurfuralul, iar ultimul, 5-clormetilfurfuralul, fiecare component având concentrațiile cf. tabelului anexat.

Fig. 2.3 Cromatograma 5-metoximetilfurfuralului

Sinteza glicerii acetalului 5-metoximetilfurfuralului, s-a realizat după următorul protocol experimental:

Într-o instalație formată dintr-un balon cu 4 găuri, prevăzut cu agitare acționată electric, pâlnie de picurare, termometru, calotă încălzită electric, condensator răcitor, asamblat cu pâlnie decantoare, se introduc 92,5 g glicerină 99,5%. Se pornește agitarea și se introduc în balon 6 g catalizator heterogen superacid de tipul acidului tungstosulfuric depus pe silice mezoporoasă. Peste amestecul din balon sub agitare, se dozează prin pâlnia de picurare în timp de 15 minute 200 g 5-metoximetilfurfural 70%. Se introduc 600 g cloroform. Se încălzește masa de reacție până începe distilarea amestecului azeotropic apă-cloroform, care se condensează în condensatorul răcitor și se separă în pâlnia decantoare, cloroformul reintroducându-se în balon, iar apa se măsoară și se îndepărtează. După 2 ore, nu se mai separă apă, iar amestecul de reacție se răcește și se îndepărtează prin filtrare catalizatorul superacid, care se poate refolosi la șarjele ulterioare. Din filtrat se separă cloroformul prin distilare. Cloroformul distilat se poate reutiliza la șarjele ulterioare. Produsul se analizează prin metoda GC-MS mai jos prezentată. Se constată o conversie de 90,19% a 5-metoximetilfurfuralului.

3. Elaborarea unor sisteme biocatalitice robuste pentru reacțiile de finalizare a biocombustibililor

Etaple de acilare avute în vedere pentru realizarea prezentului proiect au fost concepute într-un context ecocompatibil, durabil, cu mai pușini produși secundari și cu mai pușine operații. Pentru aceasta varianta enzimatică de acilare a fost preferată utilizându-se lipazele, cei mai comuni biocatalizatori utilizați atât la scară de laborator cât și la scară industrială. În ultima perioadă literatura abordează tot mai insistent metodologia enzimatică de alcooliză a trigliceridelor, care în ultimă instanță conduce la acilarea alcoolilor.

Folosirea lipazelor imobilizate prin diferite metode, cu avantajul stabilității mărite și a ușurinței de îndepărtare a enzimei din amestecul de reacție, s-a studiat pentru obținerea biodieselului clasic în sisteme batch sau în reactoare deplasare. S-au utilizat lipaze imobilizate atât covalent cât și necovalent. Deși formele de imobilizare necovalentă conservă mai bine atât structura enzimei cât și a suportului, o îndepărtare treptată a enzimei de pe suprafața suportului scade reutilizabilitatea biocatalizatorului. Imobilizarea covalentă a enzimei conduce la un biocatalizator mai stabil, însă cu o activitate mai redusă, datorată schimbărilor conformaționale generate în timpul legării pe suport. Plecându-se de la hidrofobicitatea accentuată a uleiurilor respectiv a acizilor grași atenția noastră s-a îndreptat spre utilizarea unor suporturi de tip nanotuburi de carbon, care prezintă atât o suprafața specifică ridicată cât și o hidrofobicitate pronunțată ceea ce conduce la limitări difuzionale scăzute. În plus aceste suporturi prezintă proprietăți remarcabile mecanice, termice, electrice precum și oși biocompatibilitate generală. Interacțiunea dintre nanotubul funcționalizat și lipază conduce la o structură mai rigidă a enzimei, consolidând astfel eficacitatea catalitică și stabilitatea termică a

În studiul de față s-a realizat imobilizarea lipazei B din *Candida antarctica* pe nanotuburi de carbon funcționalizate cu alchil-diamine, și folosirea preparatelor enzimice imobilizate în etanoliza uleiului de floarea soarelui. Rezultate obținute demonstrează, pentru prima dată, utilizarea cu succes a lipazelor imobilizate pe nanotuburi de carbon pentru obținerea biodieselului.

Testarea biocatalizatorului creat s-a făcut pe reacția de etanoliză a uleiului de floarea soarelui, sistem compatibil cu cel din proiect.

Imobilizarea enzimei pe nanotuburile de carbon funcționalizate cu grupări carboxil s-a făcut prin intermediul a două tipuri de reactivi bifuncționali: glicerol diglicidil eter (GDE) și ester bis-N-succinimidil-(pentaetilenglicol) (BS(PEG)5).

3.1. Materiale, metode

3.1.1. Compoziția de acizi grași al uleiului de floarea soarelui

Compoziția de acizi grași al uleiului de floarea soarelui s-a determinat conform procedurii de referință AOAC (AOAC, 2005), folosind standarde cromatografice pure de metil ester și analiză GC-FID, raportate anterior (Gog et al., 2011).

Tabel 3.1. Compoziția de acizi grași al uleiului de floarea soarelui folosit în reacțiile de transesterificare

Acid gras	Structura abreviată	Conținut (% w/w)
Acid palmitic	C16:0	6.5
Acid stearic	C18:0	3.6
Acid oleic	C18:1 (9)	26.7
Acid linoleic	C18:2 (9,12)	62.3
Acid γ -linolenic	C18:3 (6,9,12)	0.5
Acid docosanoic	C22:0	0.4

3.1.2. Legarea covalentă a enzimei CaL-B pe SWCNTCOOH prin linker de tip GDE

SWCNT_{COOH} s-a activat cu *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI, 32.4 mg, 0.2 mmol) în CH₂Cl₂ (5 mL) sub agitare (1350 rpm, temperatura camerei, peste noapte), cu sonicare ocazională pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotube (Figura 1, etapa i). După activarea cu CDI, proba a fost filtrată pe filtru de membrană, și spălată cu CH₂Cl₂ (3×1 mL).

În suspensia de SWCNT_{COOH} activat (20 mg) în apă distilată (5 mL) s-a adăugat 1,3-diaminopropan (sau 1,6-diaminooctan, sau 1,8-diaminooctan, 0.12 mmol din fiecare), iar amestecul de reacție s-a agitat (1350 rpm, temperatura camerei, peste noapte), cu sonicare ocazională pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotube (Figura 1, etapa ii). Amestecul de reacție s-a filtrat pe filtru de membrană și s-a spălat cu apă (3×1 mL).

Într-o soluție de glicerol diglicidil eter (GDE, 20 μ L, 0.12 mmol) în CH₂Cl₂ (5 mL) s-a adăugat SWCNT_{COOH} cuplat cu diamină (20 mg) și s-a agitat (1350 rpm, temperatura camerei, peste noapte) cu sonicare ocazională pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotube (Figura 3.1, etapa iii). Amestecul s-a filtrat pe filtru de membrană și s-a spălat cu CH₂Cl₂ (3×1 mL).

Într-o soluție de CaL-B (10 mg) și Tween-80 (6.5 μ L) în 6 mL de soluție tampon PBS (20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7), s-a adăugat nanotubul bisepoxi-activat (20 mg), iar amestecul s-a agitat la temperatura camerei la 1350 rpm, peste noapte (Figura 1, etapa iv). Biocatalizatorul rezultat (SWCNT_{COOH}-CaL-B(a)-3,6,8) s-a filtrat pe filtru de

membrană și s-a sonicat, respectiv s-a spălat până nu s-a detectat proteină în filtrat. Enzima imobilizată s-a liofilizat și s-a folosit în reacțiile de transesterificare enzimatică. Cantitatea de proteină imobilizată pe nanotubul bisepoxid-activată s-a determinat din diferența concentrației enzimei înainte (10 mg) și după imobilizare (0.063 mg; măsurat spectrofotometric prin metoda Bradford). Randamentul imobilizării: 99.4%, încărcare de enzimă: 0.33 (mg proteină/mg preparat enzimatic imobilizat).

3.1.3. Legarea covalentă a enzimei CaL-B pe SWCNTCOOH prin linker de tip BS(PEG)5

Procedeu printr-o singură etapă: Într-o soluție de CaL-B (10 mg) în 6 mL soluție tampon PBS (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 8) s-a adăugat 20 mg de SWCNT-NH-3,6,8, ester bis-*N*-succinimidyl-(pentaethylene glycol) (BS(PEG)₅, 6 mg) și Tween-80 (7.8 μL) (Figura 1, etapa v și vi). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de o oră. Reacția s-a stopat prin adăugare de 300 μL de soluție tampon Tris.HCl (1 M, pH 8) Cantitatea de proteină imobilizată pe nanotub s-a determinat ca și în cazul enzimei imobilizate în etapa precedentă. Randamentul imobilizării: 99.7%, încărcare de enzimă: 0.33 (mg proteină/mg preparat enzimatic imobilizat).

Procedeu în două etape: Amestecul format din BS(PEG)₅ (6 mg) și SWCNT-NH-3,6,8 (20 mg) în 1 mL soluție tampon PBS (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 8) s-a agitat la temperatura camerei timp de 30 de minute (Figura 1, etapa v). Amestecul de reacție s-a filtrat și s-a spălat cu soluție tampon PBS (3 \times 1 mL). Nanotubul BS(PEG)₅ activat rezultat s-a suspendat într-o soluție de CaL-B (10 mg) și Tween-80 (7.8 μL) în 6 mL soluție tampon PBS (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 8). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 30 de minute (Figura 1, etapa vi). Reacția s-a stopat prin adăugare de 300 μL de soluție tampon Tris.HCl (1 M, pH 8). Randamentul imobilizării s-a determinat conform metodei descrise anterior. Randamentul imobilizării: 99.3%, încărcare de enzimă: 0.33 (mg proteină/mg preparat enzimatic imobilizat).

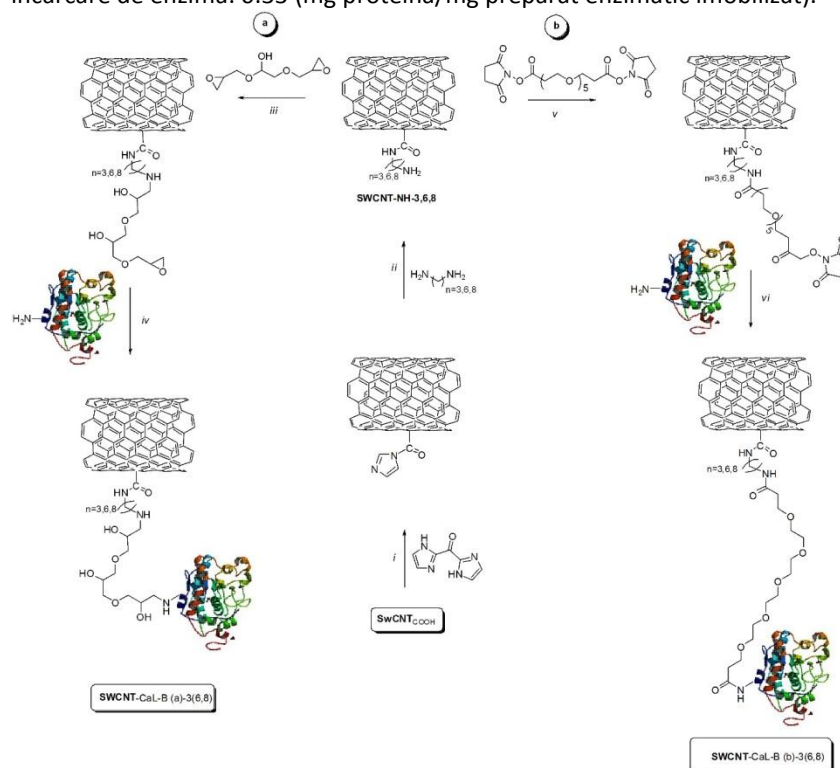


Figura 3.1. Imobilizarea enzimei CaL-B pe SWCNTCOOH. a) imobilizare cu GDE: i) CDI în CH_2Cl_2 ; ii) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ / $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ / $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_2$ în apă; iii) glycerol diglicidil eter în CH_2Cl_2 ; iv) CaL-B în soluție tampon PBS (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 7); b) imobilizare cu BS(PEG)₅: i) CDI în CH_2Cl_2 ; ii) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ / $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ / $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_2$ în apă; v) BS(PEG)₅ în DMSO; vi) CaL-B în soluție tampon PBS (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 8).

3.1.4. Obținerea biodieselului prin transesterificare enzimatică

Procedura generală: o reacție tipică s-a efectuat folosind 20 mg de ulei de floarea soarelui în 500 μL solvent organic, 3 mg de SWCNT-CaL-B și 6.5 μL etanol. Amestecurile de reacție s-a agitat (1350 rpm) la temperatura camerei timp de 3-6 ore. Reacțiile s-au centrifugat la 9840 x g (13400 rpm) timp de 1 minut, solventul din supernatant s-a concentrat, iar biodieselul obținut s-a analizat prin spectroscopie ^1H RMN. Pentru a determina solventul optim pentru reacția de transesterificare procedura generală s-a realizat folosind diferiți solvenți (Tabelul 2).

Pentru determinarea cantității optime de apă, s-au introdus următoarele modificări în procedura generală: adăugarea cantității de apă corespunzătoare (Tabelul 3) în acetoneitril, folosind amestecul astfel preparat ca și solvent pentru reacția de transesterificare.

Screening-ul concentrației de substrat s-a realizat conform procedurii generale, modificate prin utilizarea de raporturi substrat-solvent diferite (Tabelul 4), ajustând volumul final de reacție prin creșterea sau scăderea volumului inițial de acetoneitril (500 μ L), pentru a obține raporturile w/v corespunzătoare, ținând constant cantitatea de substrat (20 mg).

Pentru screening-ul concentrației de etanol s-au utilizat raporturi diferite de ulei-etanol (Tabelul 3.5). Pentru a determina preparatul enzimatic imobilizat optim, reacțiile s-au realizat folosind biocatalizatorii obținuți prin diferitele metode de imobilizare (Tabelul 3.6).

Pentru a determina temperatura optimă, reacțiile s-au efectuat la diferite temperaturi (Figura 3.5A). Pentru experimente de reutilizabilitate, reacțiile s-au efectuat cu procedura optimizată. Enzima s-a recuperat din amestecul de reacție după fiecare ciclu prin centrifugare, s-a spălat cu hexan ($2 \times 100 \mu$ L), acetoneitril ($2 \times 100 \mu$ L) și s-a reutilizat în următorul experiment (Figura 3.5B).

Profilul de timp al reacțiilor s-a obținut prin analiza reacțiilor folosind procedura optimizată după 1, 2, 3, 4, 6, 8 respectiv 16 ore.

Procedura optimizată: amestecul format din 20 mg de ulei de floarea soarelui în 100 μ L acetoneitril, 3 mg de SWCNT-CaL-B(a)-3 și 3.9 μ L etanol s-a agitat (1350 rpm) la 35°C timp de 4 ore. Amestecurile de reacție s-au centrifugat la 9840 x g (13400 rpm) timp de un minut, solventul din supernatant s-a evaporat, iar biodieselul obținut s-a analizat prin spectroscopie 1 H RMN.

3.2. Rezultate și discuții

3.2.1. Imobilizarea covalentă a enzimei CaL-B pe SWCNT_{COOH}

Imobilizarea covalentă a enzimelor poate conduce la o descreștere a activității acestora, care poate să apară datorită structurii conformaționale modificate a enzimei, sau a flexibilității reduse care apare la legarea pe suport. Numeroase studii folosesc brațe de distanțare cu lungimi diferite pentru a menține activitatea enzimei imobilizate (Rusin et al., 1992; Ching-Ching et al., 2012). Recent s-a raportat că detergentul neionic Tween-80 la o concentrație de 1 mM a îmbunătățit semnificativ activitatea enzimei TLL (*Thermomyces lanuginosa lipase*) în producția de biodiesel, sugerând faptul că în prezența surfactantului fixarea enzimei are loc într-o conformație mai activă (Zhang et al., 2015).

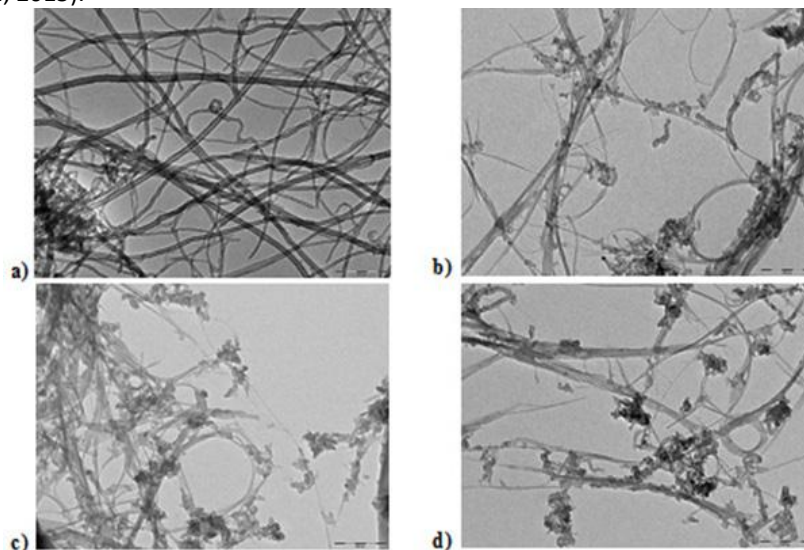


Figura 3.2. Imagini TEM: a) SWCNTNH-3: SWCNT funcționalizat cu 1,3-diaminopropan b) SWCNT-CaL-B(a)-3: CaL-B imobilizat pe SWCNT funcționalizat cu 1,3-diaminopropan folosind diglicidil eter ca și agent de reticulare; c) SWCNT-CaL-B(b)-3: CaL-B imobilizat pe SWCNT funcționalizat cu 1,3-diaminopropan folosind BS(PEG)5 ca și agent de reticulare; d) SWCNT-CaL-B(a)-după 10 cicluri de transesterificare

SWCNT_{COOH} disponibil comercial s-a activat cu carbonildiimidazol și s-a cuplat cu trei alchidiamine (propan-, hexan, octan-), obținându-se SWCNT_{COOH} amino-funcționalizat cu lungimi diferite: SWCNT-NH-3, SWCNT-NH-6, SWCNT-NH-8. În plus, folosind două tipuri de agenți de reticulare, glicerol diglicidil eter (GDE) și bis(sulfosuccinimidil)suberate PEGilat (BS(PEG)₅) nanotuburile amino-cuplate s-au activat pentru a permite legarea grupărilor amino din suprafața enzimei pe suportul activat. Imobilizarea enzimei CaL-B s-a realizat atât în prezența cât și în absența surfactantului neionic, Tween-80.

Fiecare metodă s-a caracterizat prin reproductibilitate și randament ridicat de imobilizare (>99 % din enzimă s-a legat pe SWCNT_{COOH}) cu încărcare de enzimă de 0.33 mg proteină/mg preparat enzimatic imobilizat.

Enzimele imobilizate au fost caracterizate și prin microscopie electronică de transmisie (TEM) (Figura 3.2). S-au detectat molecule de enzimă imobilizate pe suprafața nanotuburilor cu diametru de 1-2 nm, obținute prin procedee de imobilizări covalente, folosind glicerol diglicidil eter (Figura 3.2b) sau bis(sulfosuccinimidil)suberate PEGilat (Figura 3.2c) ca și agent de reticulare.

3.2.2. Transesterificarea uleiului de floarea soarelui mediată de SWCNT-CaL-B

3.2.2.1. Determinarea conversiei

Conversiile s-au determinat prin înregistrarea spectrelor ¹H-RMN ale amestecurilor de reacție, aplicând o metodă dezvoltată de Rosset et al., 2011. Astfel, s-au înregistrat spectrele biodieselului (Figura 3A) și al uleiului de floarea soarelui (Figura 3B). Spectrul ¹H-RMN al biodieselului prezintă un semnal cuartet (între 4.00 și 4.40 ppm, semnalul **a**, Figura 3A), generat de protonii asociați grupării a metilen aparținând grupării etil din esterul de etil al acidului gras. În spectrul ¹H-RMN al uleiului, în aceeași regiune, se observă un dublet de dublet asociat cu protonii metilenici **b** și **c** corespunzători fragmentului gliceril al uleiului (Figura 3B). Prin înregistrarea spectrelor ¹H-RMN al amestecului de biodiesel și ulei (Figura 3C) se observă suprapunerea cuartetului **a** din biodiesel și a dubletului de dublet **b** din ulei. Spectroscopia ¹H-RMN poate fi folosit pentru determinarea conversiei reacțiilor, doar prin construirea prealabilă a unei curbe de calibrare. În acest scop s-au înregistrat spectre ¹H-RMN ale unor amestecuri de ulei și biodiesel. Reprezentând grafic conținutul de biodiesel (wt. %) în funcție de raportul integralelor semnalelor **c/(a+b)**, s-a construit o curbă neliniară (Figura 4). Considerând masa moleculară a uleiului 877.5 g/mol, calculată din compoziția determinată de acizi grași al acestuia, conversia reacțiilor s-a calculat folosind funcția din Figura 3.4.

3.2.2.2. Investigarea influențelor parametrilor de lucru asupra conversiei

Activitatea preparatelor de enzime imobilizate s-a testat în etanoliza uleiului de floarea soarelui. Procesul de etanoliză s-a preferat procesului de metanoliză datorită biodegradabilității etanolului. Condițiile optime de reacție s-au determinat prin efectuarea a mai multor screening-uri, folosind ca și preparat enzimatic model SWCNT-CaL-B(a)-6, obținut prin imobilizare cu 1,6-diaminohexan și GDE în prezență de Tween-80.

3.2.2.2.1. Efectul solventului asupra obținerii de biodiesel

Pentru a îmbunătăți solubilitatea trigliceridelor hidrofobi și ai alcoolilor hidrofilii, dar și pentru a proteja enzima de denaturarea cauzată de concentrații mari de alcooli, diverși solvenți organici s-au testat pentru sinteza eficientă de biodiesel. În general s-a constatat că solvenții organici hidrofobi (izooctan, *n*-heptan, *n*-hexan, eter de petrol, ciclohexan) sunt adecvați, însă acești solvenți nu dizolv glicerolul format ca produs secundar, care se poate adsoarbe pe suprafața lipazei imobilizate, ducând astfel la scăderea activității enzimatice (Kawakami et al., 2011). Solvenții organici hidrofilii pot interacționa cu stratul de apă care învelește moleculele de enzimă; totuși folosind 1,4-dioxan și *tert*-butanol s-au obținut randamente mari de transesterificare (Lotti et al., 2015). Realizând reacțiile în solvenți diferiți, folosind SWCNT-CaL-B(a)-6, ca și biocatalizator model, s-a constatat că acetoneitrilul este solventul optim, conversia reacției ajungând la 63 % după 4 ore (Tabel 3.2, nr. 2), pe când doar în etanol (fără solvent), conversia a fost de doar 20% (Tabel 2 intrarea 2). Conversii mai mici s-au observat în *tert*-butanol, diizopropileter (DIPE) și *tert*-butilmetileter (t-BME) (Tabel 3.2, nr. 3-5), însă în alți solvenți, inclusiv în solvenți hidrofobi nu s-a detectat formarea de biodiesel (Tabel 2, nr. 6-16).

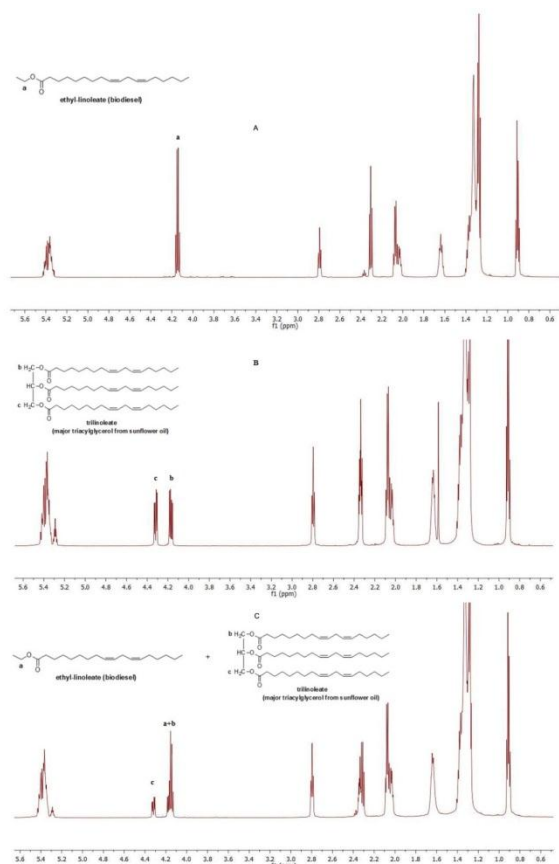


Figura 3.3. Spectre 1H-RMN: A) Biodiesel obținut prin etanoliza chimică al uleiului de floarea soarelui B) ulei de floarea soarelui; C) amestec format din biodiesel și ulei de floarea soarelui (Structurile s-au reprezentat folosind acidul gras majoritar din uleiul de floarea soarelui, acidul linoleic)

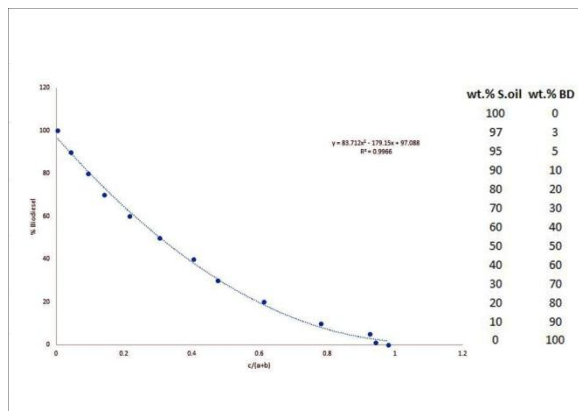


Figura 3.4. Curba de calibrare obținută prin reprezentarea raportului integralelor semnalelor $c/(a+b)$ din spectrele 1H-RMN a 13 probe cu conținut diferit de ulei-biodiesel.

Nr.	Solvent	Conversie(%)
1	EtOH	20.7
2	ACN	63.5
3	<i>t</i> -BuOH	30.3
4	DIPE	12.1
5	<i>t</i> -BME	9.51
6	1,4-Dioxane	<5
7	Heptane	<5
8	Hexane	<5
9	Octane	<5
10	Isooctane	<5
11	CH ₂ Cl ₂	<5
12	CCl ₄	<5
13	DMF	<5
14	THF	<5
15	Acetone	<5
16	EtOAc	<5

Tabel 3.2. Efectul naturii solventului asupra transesterificării uleiului de floarea soarelui mediată de SWCNT-CaL-B(a)-6 de după 4 ore de reacție

3.2.2.2.2. Efectul conținutului de apă asupra obținerii biodieselului

Conținutul de apă al amestecului de reacție are o influență puternică asupra stabilității și activității catalitice ale lipazelor atunci când se investighează transesterificarea enzimatică a triacilglicerolilor în mediu neapos. În general, activarea interfacială a lipazelor implică schimbări conformaționale ale enzimei, randamentul transesterificării fiind îmbunătățit la mărirea suprafeței interfaciale, care poate realiza prin adăugarea de anumite cantități de apă. Lipaza B din *Candida antarctica* (CaL-B) nu necesită activare interfacială, activitatea cea mai mare fiind atinsă cu cantități mici de apă (Ognjanovic et al., 2009). Excesul de apă poate facilita reacția de hidroliză competitivă, ducând la descreșterea randamentului de transesterificare. Datele din literatură arată că un conținut de apă de până la 5% poate fi benefic randamentului de transesterificare (Gog et al, 2012).

Efectuând etanoliza uleiului de floarea soarelui, catalizată de SWCNT-CaL-B(a)-6, cu cantități diferite de apă (0-5 vol. %), rezultatele au fost concordante cu datele din literatură. Astfel, în prezența unor cantități mici de apă (0.1- 0.5 vol. %), conversia transesterificării a crescut ușor, însă prin prezența unor cantități mai mari de apă activitatea enzimei a scăzut continuu (Tabel 3).

Nr.	Conținut de apă (vol. %)	Conversie (%)	Nr.	Conținut de apă (vol. %)	Conversie (%)
1	0	56.9	1	0	56.9
2	0.1	59.2	2	0.1	59.2
3	0.5	58.5	3	0.5	58.5
4	1	49.5	4	1	49.5
5	1.5	46.7	5	1.5	46.7
6	2	38.5	6	2	38.5
7	3	34.6	7	3	34.6
8	4	42.3	8	4	42.3
9	5	34.9	9	5	34.9

Tabel 3.3. Efectul conținutului de apă asupra reacției de transesterificare (după 3 ore)

3.2.2.2.3 Efectul raportului substrat-solvent asupra procesului de transesterificare

Nr.	Raport substrat- ACN (w/v)	Conversie (%)*
1	1:1	6.9
2	1:2	17.5
3	1:5	58.9
4	1:10	51.5
5	1:20	52.2
6	1:25	52.1
7	1:50	37.2

Concentrația de substrat poate avea o influență semnificativă asupra activității biocatalizatorului, astfel, din punct de vedere al eficacității costului procesului este necesară determinarea optimă de substrat. Testând etanoliza catalizată de SWCNT-CaL-B(a)-6, variind conținutul de ulei din amestecul de reacția, conversia maximă s-a obținut la raportul substrat-solvent de 1:5 (w/v) (Tabel 3.4).

Tabel 3.4. Efectul concentrației de substrat asupra producției de biodiesel (după 3 ore)

3.2.2.2.3. Efectul concentrației de etanol

Deasemenea, și cantitatea de nucleofil poate influența semnificativ viteza de reacție a proceselor de transesterificare biocatalitică (Gog et al, 2012). Prin modificarea raportului amestecului de ulei-etanol fixat inițial (1:5), s-a constatat că valori ale conversiei mai ridicate se obțin la conținut de etanol scăzut. Conținutul ridicat de etanol duce la descreșterea semnificativă a activității enzimei (Tabel 3.5). Astfel, în continuare s-a folosit raportul stoichiometric de ulei-etanol minim (1:3).

Nr.	Raport molar ulei-etanol	Conversie (%)*
1	1:1	46.7
2	1:3	59.7
3	1:5	58.3
4	1:10	38.7
5	1:20	42.2
6	1:50	20.7

Tabel 3.5. Efectul raportului ulei-etanol asupra procesului de transesterificare (3 ore)

3.2.2.2.4. Efectul tipului și a lungimii agentului de reticulare asupra obținerii de biodiesel

Folosind condițiile de reacție optimizate, în continuare s-a testat activitatea catalitică a preparatelor enzimatiche imobilizate prin diferite metode. Prezența surfactantului în timpul imobilizării enzimei poate influența activitatea catalitică al enzimelor (Zhang et al., 2015). Și în cazul nostru, enzima imobilizată în absența surfactantului (Tabel 6, nr. 2,7) a prezentat activitate enzimatică mai scăzută decât cea imobilizată în prezență de Tween-80 (Tabel 6, nr. 1,6).

În plus, în cazul ambelor proceduri de imobilizare (a și b), lungimea brațului de distanțare a furnizat rezultate interesante. Folosirea unor linkeri cu lungimi mai mari are efect negativ asupra eficacității enzimei, linkerul mai scurt, 1,3-diaminopropanul, furnizând activități enzimatiche ridicate (Tabel 3.6, nr. 1, 5).

În toate cazurile procedura de imobilizare folosind agentul de reticulare mai scurt, diglicidil eterul (Tabel 3.6, nr. 1-4), a asigurat rezultate superioare celor folosind agentul de reticulare mai lung (Tabel 3.6, nr. 5-11).

Folosind BS(PEG)₅ drept spacer, metoda de imobilizare în două etape a condus la un biocatalizator mai activ.

Cu creșterea lungimii linkerului activitatea enzimatică scade, sugerând faptul că o flexibilitate mai ridicată a enzimelor imobilizate are un efect negativ asupra producției de biodiesel. Acest rezultat este în contradicție cu observațiile precedente, care consideră că un spacer mai lung descrește rigiditatea enzimei imobilizate covalent (Idris and Bukhari, 2012), însă sunt în conformitate cu rezultatele care dovedesc că prin rigidizarea situsului activ al enzimei CaL-B se mărește activitatea enzimatică. (Hong and Yoo, 2013). În opinia noastră, linkerul mai lung facilitează fixarea în mai multe puncte a aceleiași molecule de enzimă pe suprafața nanotubului, rezultând un biocatalizator durabil legat, dar cu o activitate scăzută.

Nr.	Enzima imobilizată	Linker	Conversie (%)**
1	SWCNT-CaL-B(a)-3	1,3-diaminopropan	79.9
2	SWCNT-CaL-B(a)-3*	1,3-diaminopropan	30.3
3	SWCNT-CaL-B(a)-6	1,6-diaminohexan	63.2
4	SWCNT-CaL-B(a)-8	1,8-diaminooctan	20.4
5	SWCNT- CaL-B(b)-3-1	1,3-diaminopropan	37.2
6	SWCNT-CaL-B(b)-3-2	1,3-diaminopropan	50.8
7	SWCNT-CaL-B(b)-3-2*	1,3-diaminohexan	20.2
8	SWCNT- CaL-B(b)-6-1	1,6-diaminohexan	30.1
9	SWCNT-CaL-B(b)-6-2	1,6-diaminopropane	39.7
10	SWCNT- CaL-B(b)-8-1	1,8-diaminopropane	21.1
11	SWCNT- CaL-B(b)-8-2	1,8-diaminopropane	27.6

Tabel 3.6. Efectul tipului de imobilizare asupra obținerii de biodiesel. (*imobilizare fără Tween, ** timp de reacție 4 ore)

3.2.2.2.5. Efectul temperaturii

Pentru a preveni inactivarea termică a biocatalizatorilor, transesterificările enzimatiche se realizează, în general, la temperaturi mai scăzute decât cele chimice. Temperatura operațională pentru producerea biodieselului pentru o serie de lipase se încadrează în domeniul de temperatură 20-55 °C (Gog et al., 2012). Prin urmare s-a investigat efectul temperaturii asupra etanolizei mediate de SWCNT-CaL-B(a)-3. Enzima a arătat activitate maximă la temperatura de 35 °C, creșterea temperaturii peste această valoare a condus la descreșterea activității enzimatiche (Figura 3.5A).

3.2.2.3.Reutilizabilitatea biocatalizatorului

Fiind biocatalizatori cu cost ridicat, reutilizabilitatea lipazelor este crucială pentru utilizarea lor la scară industrială. CaL-B imobilizat covalent este adecvat pentru folosire pe termen îndelungat, deoarece enzima nu se desprinde de pe suprafața suportului. S-a testat reutilizabilitatea enzimei imobilizate SWCNT-CaL-B(a)-3 folosind condițiile optime determinate, în proceduri batch repetate. După fiecare reacție biocatalizatorul s-a spălat cu hexan și acetonitril și s-a uscat. După 10 reacții repetate enzima și-a păstrat peste 90% din activitatea inițială (Figura 3.5B). Imaginile TEM ale biocatalizatorului utilizat în 10 cicluri consecutive sunt similare cu cele ale enzimei proaspăt imobilizate (Figura 2d), sugerând formarea legăturilor covalente stabile.

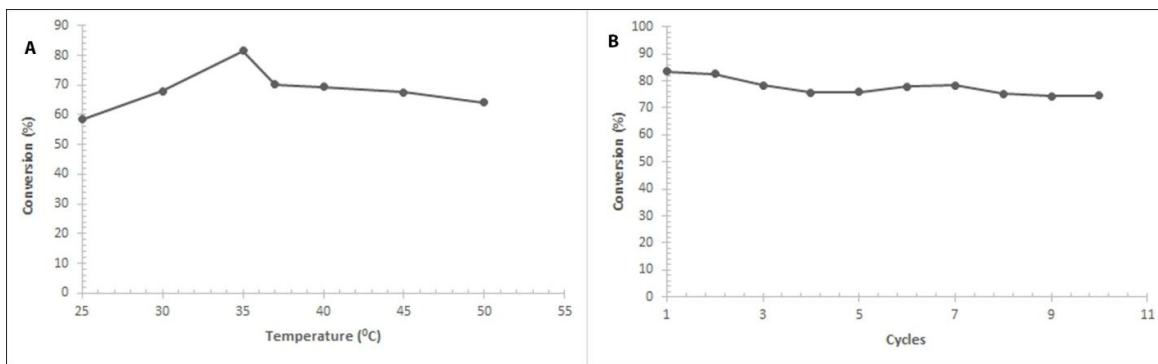


Figura 3.5. A) Efectul temperaturii asupra transesterificării enzimatică după 3 ore de reacție B) Studiul reutilizabilității enzimei SWCNTCOOH-CaL-B(3); timp de reacție 4 ore)

3.2.2.3. Profilul de timp al reacției de transesterificare

Profilul de timp arată că reacția decurge rapid în primele patru ore, ajungând la o conversie de 83.4%, după care creșterea conversiei încetinește, ajungând la 93.1% după 16 ore (Figura 3.6).

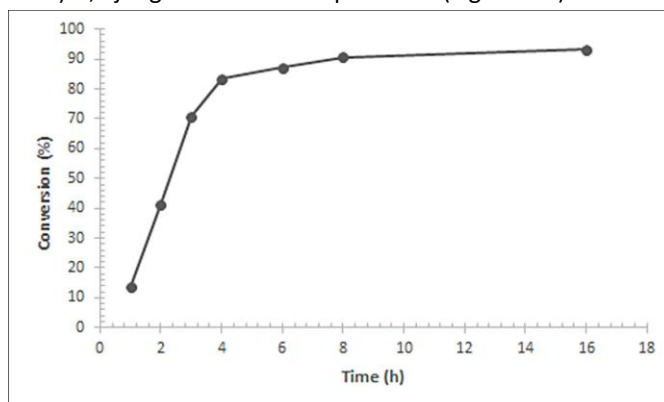


Figura 3.6 Profilul de timp al transesterificării uleiului de floarea soarelui

3.3. Concluzii

Prin imobilizarea covalentă a lipazei B din *Candida antarctica* în prezența surfactantului neionic, Tween-80 pe nanotuburi de carbon cu un singur perete funcționalizate cu grupări carboxi (SWCNT_{COOH}) s-a dezvoltat un biocatalizator util pentru obținerea biodieselului.

S-a observat o influență puternică a lungimii brațului de distanțare asupra activității enzimei, linkeri mai scurți permițând enzime imobilizate mai active. Cel mai activ preparat enzimatic, CaL-B imobilizat cu glicerol diglicidil eter pe nanotuburi funcționalizate cu 1,3-diaminopropan (SWCNT-CaL-B(a)-3), în urma mai multor optimizări, a condus la conversii ridicate în reacția de etanoliză a uleiului de floarea soarelui. Structura asemănătoare a conjugatilor acilati din prezentul proiect ne dau convingerea că acest nou catalizator introdus de către noi va da satisfacție. Studiile de reutilizabilitate au demonstrat că SWCNT-CaL-B(a)-3 are o stabilitate operațională ridicată, enzima păstrându-și peste 90% din activitatea inițială după 10 cicluri.

CONCLUZII FINALE

OBIECTIVELE ETAPEI AU FOST INDEPLINITE, REZULTATELE OBȚINUTE FIIND VALITATE PRIN DISEMINARE ÎN COMUNITATEA ȘTIINȚIFICĂ.

Prof. Dr. Ing. FLORIN DAN IRIMIE

4. DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRII AFERENTE ETAPEI DIN ANUL 2015

Datele obținute în urma investigațiilor experimentale originale proprii etapei derulate în anul 2015, precum și în cadrul etapelor anterioare, au fost incluse în:

1 articol publicat in reviste cotate ISI (factor de impact 4.494)

1. Bencze L. C.; Bartha-Vári J.; Katona G.; Toșa M. I.; Paizs C.; Irimie F. D.: **Nanobioconjugates of *Candida Antarctica* lipase B and single-walled carbon nanotubs in biodiesel production**, *Bioresource Technology*, **2016**, *200(1)*, 853-860.

1 cerere brevet de inventive depus la OSIM

1. Stepan Emil, Velea Sanda, Vasilievici Gabriel, Radu Elena, Radu Adrian, Oprescu Elena-Emilia, Enășcuță Cristina-Emanuela: **Biocarburant diesel pe bază de derivați ai furfuriliden glicerolului și procedeu pentru obținerea acestuia**, cererii de brevet de invenție A/00753 / 22.10.2015

3 participari la conferinte internationale

1. B. Nagy, Z. Galla, C. Paizs, E. Forró, F. Fülöp, F. D. Irimie: **Synthesis and enzymatic kinetic resolution of novel 3- amino-3-(5-phenylfuran-2-yl)propanoic acid ethyl esters**, *IsySyCat (International Symposium on Synthesis and Catalysis)*, Evora, 2-4 September 2015, Portugal
2. Paula Podea, Sonia Suvar, Monica Culea, Florin Dan Irimie: **Comparative Study for Analysis of High-Value Essential Oils from Indigenous Oil Seeds Crops from Romania**, *15thInternational Symposium and Summer School on Bioanalysis*, 13-18 July 2015, Tg. Mures, Romania
3. Stepan Emil, Velea Sanda, Irimie Florin Dan, Radu Elena, Oprescu Elena-Emilia, Radu Adrian, Vasilievici Gabriel: **New class of glycerol acetal derivatives with characteristics of diesel biofuel**, *19th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering"- RICCCCE 19* , 2-5 septembrie 2015, Sibiu.