

UNIVERSITATEA “ȘTEFAN CEL MARE” DIN SUCEAVA
FACULTATEA DE INGINERIE ALIMENTARĂ
Domeniul Ingineria Produselor Alimentare

TEZĂ DE DOCTORAT
- REZUMAT -

Coordonator științific:
Prof. univ. dr. ing. Gheorghe GUTT

Doctorand:
Ing. Vasile-Florin URSACHI

Suceava
2022

UNIVERSITATEA “ȘTEFAN CEL MARE” DIN SUCEAVA
FACULTATEA DE INGINERIE ALIMENTARĂ
Domeniul Ingineria Produselor Alimentare

CERCETĂRI PRIVIND OBTINEREA
BIOETANOLULUI DIN DEȘEURI VEGETALE
REZUMAT

Coordonator științific:
Prof. univ. dr. ing. Gheorghe GUTT

Doctorand:
Ing. Vasile-Florin URSACHI

Suceava
2022

„Nu zi niciodată nu se poate, ci începe cu să vedem.”

Nicolae Iorga

Mulțumiri

Doresc să aduc mulțumiri speciale domnului ***Prof. univ. dr. ing Gheorghe GUTT*** care mi-a fost alături în calitate de conducător științific, mi-a oferit toată susținerea și încurajările dumnealui pe toată perioada studiilor doctorale.

Adresez cuvinte de mulțumire membrilor comisiei de îndrumare, doamnei ***Prof. univ. dr. ing. Sonia AMARIEI***, domnului ***Prof. univ. dr. ing. Mircea-Adrian OROIAN*** și doamnei ***Prof. univ. dr. ing. Silvia MIRONEASA*** pentru recomandările și sfaturile pe care mi le-au acordat pe tot parcursul elaborării tezei de doctorat. De asemenea, adresez mulțumiri către întregul colectiv al Facultății de Inginerie Alimentară și colegilor de doctorat care m-au susținut și încurajat permanent.

Țin să mulțumesc în mod special cumnatului meu ***Alexandru-Gheorghe*** și surorii mele ***Marinela*** pentru încurajări și sprijinul necondiționat. Le mulțumesc în mod deosebit ***părinților mei*** pentru toate lucrurile și sacrificiile pe care le-au făcut pentru mine, pentru educația oferită dar și pentru ceea ce Sunt, Știu și Simt.

Vasile-Florin URSACHI

CUPRINS

Listă de termeni și abrevieri	10
Scopul și obiectivele științifice ale tezei de doctorat	11
Introducere	12
Capitolul I. Stadiul actual al cercetărilor privind obținerea bioetanolului	14
I.1. Biocombustibilii	14
I.2. Clasificarea biocombustibililor	14
I.3. Proprietățile fizico-chimice ale etanolului și benzinei	15
I.4. Producția anuală de bioetanol la nivel mondial	18
I.5. Principalele materii prime utilizate la producția de bioetanol de primă generație	19
I.5.1. Structura chimică a moleculei de amidon	19
I.5.2. Compoziția chimică a materiei prime utilizate pentru producția de bioetanol de primă generație	20
I.5.3. Randamentul bioetanolului de primă generație obținut din diverse materii prime	21
I.5.4. Avantaje și dezavantaje ale producției de bioetanol de primă generație	23
I.6. Principalele materii prime utilizate la producția de bioetanol de a doua generație	23
I.6.1. Structura biomasei lignocelulozice	23
I.6.2. Compoziția chimică a materiei prime utilizate pentru producția de bioetanol de a doua generație	27
I.6.3. Randamentul de bioetanol de a doua generație obținut din diverse materii prime	30
I.7. Principalele materii prime utilizate la producția de bioetanol de a treia generație	30
I.7.1. Algele și microalgele	30
I.8. Concluzii	32
Capitolul II. Conversia biomasei lignocelulozice în bioetanol	33
II.1. Metode de obținere a bioetanolului din materiale lignocelulozice	33
II.2. Tipuri de pretratamente	34
II.2.1. Pretratamente fizice	34
II.2.1.1. Măcinarea	34
II.2.1.2. Pretratarea cu microunde	34

II.2.1.3. Pretratarele cu ultrasunete	35
II.2.1.4. Pretratarele în câmp electric pulsatoriu	35
II.2.2. Pretratarele chimice	36
II.2.2.1. Pretratarele cu acid	36
II.2.2.2. Pretratarele alcaline	37
II.2.2.3. Pretratarele cu ozon	38
II.2.2.4. Pretratarele cu solvenți organici	38
II.2.2.5. Pretratarele cu lichide ionice	39
II.2.2.6. Pretratarele cu solvenți eutectici profunzi	40
II.2.3. Avantajele și dezavantajele pretratarele fizice și chimice	41
II.3. Metode de hidroliză aplicate biomasei lignocelulozice	42
II.3.1. Hidroliza acidă	42
II.3.2. Hidroliza enzimatică	42
II.3.2.1. Influența caracteristicilor peretelui celular asupra procesului de hidroliză	44
II.3.2.2. Clasificarea procedeele de hidroliză enzimatică	45
II.3.2.3. Descrierea procesului enzimatic	47
II.3.2.4. Enzime utilizate pentru hidroliza peretelui celular	49
II.3.3. Analiză comparativă între hidroliza enzimatică și hidroliza acidă	53
II.4. Concluzii	53
Capitolul III. Materiale, echipamente și metode	55
III.1. Materiale lignocelulozice	55
III.2. Reactivi	55
III.2.1. Caracteristicile preparatelor enzimatic utilizate la obținerea bioetanolului	55
III.3. Echipamente	57
III.4. Procedura de obținere a bioetanolului	58
III.4.1. Pretratarele mecanice	58
III.4.2. Pretratarele fizico-chimice	59
III.4.3. Hidroliza enzimatică a paielor de grâu pretratate/rumegușului pretrat	60
III.4.4. Fermentația zaharurilor	60
III.4.5. Distilarea plămezilor celulozice fermentate	62
III.5. Metode de analiză	63
III.5.1. Determinarea cenușii din materialele lignocelulozice	63
III.5.2. Determinarea solidelor totale din materialele lignocelulozice și a solidelor totale dizolvate în fracțiile lichide	64
III.5.3. Determinarea conținutului de celuloză din materialele lignocelulozice	64

III.5.4. Determinarea conținutului de lignină din materialele lignocelulozice	65
III.5.5. Determinarea umidității materialelor lignocelulozice	66
III.5.6. Analiza microstructurii prin microscopia electronică cu scanare	66
III.5.7. Analiza spectroscopică în infraroșu cu transformată Fourier	67
III.5.8. Determinarea compușilor fenolici individuali	67
III.5.9. Determinarea acizilor organici	68
III.5.10. Determinarea carbohidraților individuali	69
III.5.11. Determinarea concentrației de bioetanol din distilat	69
III.6. Proiectarea experimentelor și analiza statistică	71
III.7. Concluzii	71
Capitolul IV. Studiu experimental privind obținerea bioetanolului din paie de grâu	72
IV.1. Introducere	72
IV.2. Influența pretratamentului asupra microstructurii și compoziției chimice a paielor de grâu	73
IV.2.1. Microstructura paielor de grâu	74
IV.2.2. Structura paielor de grâu prin FTIR-ATR	76
IV.2.3. Conținutul de compuși fenolici individuali	78
IV.2.4. Conținutul de acizi organici	81
IV.3. Influența condițiilor hidrolizei enzimactice asupra structurii și compoziției paielor de grâu pretratate	84
IV.4. Monitorizarea concentrației de bioetanol	96
IV.5. Concluzii	100
Capitolul V. Studiu experimental privind obținerea bioetanolului din rumeguș de molid	101
V.1. Introducere	101
V.2. Influența pretratamentului asupra microstructurii și compoziției chimice a rumegușului de molid	102
V.2.1. Microstructura rumegușului de molid	102
V.2.2. Structura rumegușului de molid prin FTIR-ATR	104
V.2.3. Conținutul de compuși fenolici individuali	107
V.2.4. Conținutul de acizi organici	110
V.3. Influența condițiilor hidrolizei enzimactice asupra structurii și compoziției rumegușului de molid pretrat	112
V.4. Monitorizarea concentrației de bioetanol	123
V.5. Analiză comparativă între obținerea bioetanolului din rumeguș de molid și paie de grâu	124
V.6. Concluzii	127

Capitolul VI. Concluzii generale	129
Bibliografie	132
Diseminarea rezultatelor cercetărilor	153
Anexe	155

Listă de termeni și abrevieri

Biocombustibili – combustibili lichizi sau gazoși pentru transport, produși din biomasă.

Biomasă – partea biodegradabilă a produselor, deșeurilor și reziduurilor din agricultură (inclusiv substanțele vegetale și animale), sectorul forestier și ramurile industriale aferente, precum și partea biodegradabilă a deșeurilor industriale și municipale.

Bioetanol – etanol produs din biomasă și/sau fracția biodegradabilă a deșeurilor, în vederea utilizării ca biocombustibil.

Vehicul multicomcombustibil cu etanol – vehicul multicomcombustibil care poate funcționa cu benzină sau cu un amestec de benzină și etanol de până la 85% amestec de etanol (E85).

BLC – biomasă lignocelulozică

CBH – celobiohidrolază

CBP – procedeu de bioprosesare consolidată (consolidated bioprocessing)

DAD – detector Diode-Array

DAP – fosfat de diamoniu (diammonium phosphate)

DES – solvenți eutectici profunzi (deep eutectic solvents)

DP – grad de polimerizare (degree of polymerization)

EG – endoglucanază

EJ – exajoule

FID – detector cu ionizare în flacără

FPU – activitatea enzimatică a celulelor (filter paper units)

FTIR – spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier

GC – cromatografie de gaze

HPLC – cromatografie de lichide de înaltă performanță

IEA – Agenția Internațională pentru Energie (International Energy Agency)

IL – lichide ionice (ionic liquids)

IRENA – Agenția Internațională pentru Energie Regenerabilă (International Renewable Energy Agency)

MLC – materiale lignocelulozice

MW – microunde (microwave)

PCA – analiza componentelor principale

PEF – câmp electric pulsatoriu (pulsating electric field)

RFA – Asociația Combustibililor Regenerabili (Renewable Fuels Association)

RID – detector de indice de refracție

SEM – microscopie electronică cu scanare

SHF – procedeu de hidroliză și fermentare separată (separate hydrolysis and fermentation)

SPORL – pretratament cu sulfite pentru a reduce rezistența lignocelulozei (sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose)

SSCF – procedeu de zaharificare și cofermentare simultană (simultaneous saccharification and co-fermentation)

SSF – procedeu de zaharificare și fermentare simultană (simultaneous saccharification and fermentation)

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Titlul tezei de doctorat este „*Cercetări privind obținerea bioetanolului din deșeuri vegetale*”.

Scopul tezei de doctorat constă în obținerea de bioetanol ca urmare a valorificării biomasei lignocelulozice considerată a fi un deșeu vegetal.

Cercetările realizate în vederea îndeplinirii scopului propus au vizat următoarele obiective:

- Realizarea unui studiu al literaturii de specialitate referitor la stadiul actual al cercetărilor și realizărilor în ceea ce privește transformarea biomasei lignocelulozice în bioetanol.
- Definirea unei strategii logistice privind materialele și metodele de analiză implementate în cadrul cercetărilor.
- Studiarea și caracterizarea proprietăților fizico-chimice ale biomasei lignocelulozice pentru a identifica care dintre acestea asigură randamente mai ridicate în bioetanol.
- Stabilirea unui pretratament adecvat care să permită îndepărtarea cât mai eficientă a ligninei din structura materialelor lignocelulozice și de a facilita hidroliza enzimatică.
- Utilizarea unor preparate enzimatică în vederea obținerii de bioetanol din materiale lignocelulozice.

Cuvinte cheie: paie de grâu, rumeguș de molid, pretratament, hidroliză enzimatică, carbohidrați, fermentare, bioetanol

Teza de doctorat intitulată „CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA BIOETANOLULUI DIN DEȘEURI VEGETALE” conține *Introducere* și 6 capitole, după cum urmează: două capitole care conțin informații despre stadiul actual al cercetărilor privind conversia biomasei lignocelulozice în bioetanol, un capitol de *Materiale și metode*, două capitole care cuprind cercetările efectuate pentru obținerea bioetanolului din paie de grâu și din rumeguș de molid și un capitol final în care sunt prezentate *Concluzii generale*.

INTRODUCERE

Teza de doctorat abordează o tematică de actualitate referitoare la obținerea de bioetanol din materiale lignocelulozice (MLC) care rezultă în urma recoltării cerealelor și a exploatărilor forestiere și care poate fi utilizat ca biocarburant.

Justificarea acestei teme are la bază faptul că în ultimii ani numeroase țări au adoptat o strategie de a înlocui combustibilii convenționali care sunt obținuți în urma rafinării petrolului cu biocombustibilii. Acest lucru s-a întâmplat datorită creșterii prețurilor petrolului, epuizării rezervelor de petrol, creșterii emisiilor de gaze cu efect de seră și a impactului negativ asupra mediului înconjurător.

O alternativă ar fi biomasa lignocelulozică (BLC) care este o sursă organică naturală larg răspândită, există în cantități mari, la costuri reduse și nu face parte din lanțul alimentar uman.

Fiind considerată o sursă de energie regenerabilă, BLC reprezintă o sursă importantă de energie și de produse chimice pentru generațiile viitoare. Rapoartele arată că alimentarea cu biocombustibil din biomasă la nivel mondial poate crește de la o valoare actuală de 30-140 EJ (exajouli) energie primară la 130-400 EJ până în anul 2070 [De'15]. Agenția Internațională pentru Energie (IEA) estimează că până în anul 2050 biocombustibilii vor reprezenta 27% din totalul combustibililor folosiți pentru transport [In'11].

În contextul actual al căutării intensive a surselor de energie prietenoase cu mediul și a promovării bioeconomiei circulare, paiele agricole și reziduurile lemnoase care rezultă în urma activităților forestiere prezintă un interes deosebit. O valorificare superioară a acestor biomase o reprezintă transformarea lor în bioetanol cu destinație specială ca aditiv de până la 7% în benzine, dar și pentru alte utilizări, ca de exemplu obținerea de hidrogen și/sau gaz de sinteză [Ta'10b].

Principalii constituenți din BLC sunt: celuloza (40-45%), hemiceluloza (25-35%) și lignina (20-30%). De asemenea, BLC conține o cantitate redusă de substanțe extractibile (cum ar fi lipide, uleiuri esențiale, rășini, proteine, carbohidrați simpli, amidon, apă), hidrocarburi și cenușă [Me'12a]. Celuloza este formată dintr-un lanț lung de molecule de glucoză legate între ele prin legături glicozidice β (1-4) [Wa'14]. Hemicelulozele sunt polizaharide eterogene formate din glucoză, manoză, arabinoză, ramnoză și alte zaharuri [Na'17], [Ol'19]. Lignina este un polimer compus din unități fenilpropanoide (subunități guaiacil (G), siringil (S) și *p*-hidroxifenil (H)) [Ra'22].

Principalele etape ale procesului de obținere a bioetanolului din MLC se referă la recepția materiei prime lignocelulozice, stabilirea tipului de pretratament, hidroliza acidă sau enzimatică, fermentarea plămezii și distilarea/deshidratarea bioetanolului.

Stabilirea pretratamentului adecvat în procesul de obținere a bioetanolului este importantă deoarece în această etapă se urmărește dezintegrarea ligninei, degradarea hemicelulozei, modificarea cristalinității și a gradului de polimerizare a celulozei. De asemenea, etapa de pretratament contribuie la obținerea unor randamente mari de carbohidrați, respectiv bioetanol de a doua generație.

Procesul de hidroliză enzimatică se referă la o reacție în mai multe etape pentru a converti polizaharidele peretelui celular în zaharuri simple prin intermediul unui grup de enzime produse de specii bacteriene și fungice. Spre deosebire de alte tehnologii de hidroliză, celulazele nu eliberează în hidrolizat reziduuri care pot acționa ca inhibitori ai procesului de fermentație. Totuși, în timpul hidrolizei enzimatice, lignina poate interacționa cu enzimele, afectând astfel negativ hidroliza enzimatică a biomasei [Ga'20], [Ra'19]. Cu toate acestea, există mai mulți factori care influențează hidroliza enzimatică, cum ar fi inhibarea enzimatică de către oligozaharide și inhibitori derivați de biomasă, non-sinergismul, interacțiunile neproductive enzimă-lignină etc. [Ab'16], [Wa'18], [Xi'19], [Da'20], [Hu'22].

Capitolul I prezintă stadiul actual al cercetărilor privind obținerea de bicomcombustibili la nivel mondial din biomasa lignocelulozică.

I.1. Biocomcombustibili

Legislația în vigoare a Uniunii Europene și anume art. 2, alin. (1) lit. (a) din cadrul directivei 2003/30/CE a Parlamentului Uniunii Europene și a Consiliului Uniunii Europene din 8 mai 2003 definește *biocomcombustibili* ca fiind combustibili lichizi sau gazoși pentru transport, produși din biomasă. Conform art. 2, alin. (1), lit. (a) din cadrul aceleiași directive, *biomasa* este definită ca fiind partea biodegradabilă a produselor, deșeurilor și reziduurilor din agricultură (inclusiv substanțele vegetale și animale), sectorul forestier și ramurile industriale aferente, precum și partea biodegradabilă a deșeurilor industriale și municipale. Art. 2, alin. (2), litera (a) definește „bioetanolul” ca fiind etanol produs din biomasă și/sau fracția biodegradabilă a deșeurilor, în vederea utilizării ca biocomcombustibil.

Conform Jurnalului Oficial al Uniunii Europene din data de 15 februarie 2019, „vehicul multicomcombustibil cu etanol” este definit ca fiind

vehicul multicomcombustibil care poate funcționa cu benzină sau cu un amestec de benzină și etanol de până la 85 % amestec de etanol (E85) [JOF'19].

Producția globală de biocombustibili a crescut semnificativ în ultimul deceniu. Biocombustibilii de primă generație au fost identificați ca fiind o preocupare majoră deoarece sunt produși din culturi alimentare (cum ar fi cerealele, trestia de zahăr și uleiurile vegetale) și prin urmare pot genera o penurie de alimente dar și implicit o creștere a prețului produselor alimentare.

I.2. Clasificarea biocombustibililor

În funcție de materia primă și tehnologia utilizată pentru producerea biocombustibililor secundari, aceștia se clasifică astfel [Si'11], [No'14]:

- biocombustibili de prima generație;
- biocombustibili de a doua generație;
- biocombustibili de a treia generație.

În figura I.1 este prezentată schematic clasificarea biocombustibililor în funcție de substratul utilizat.

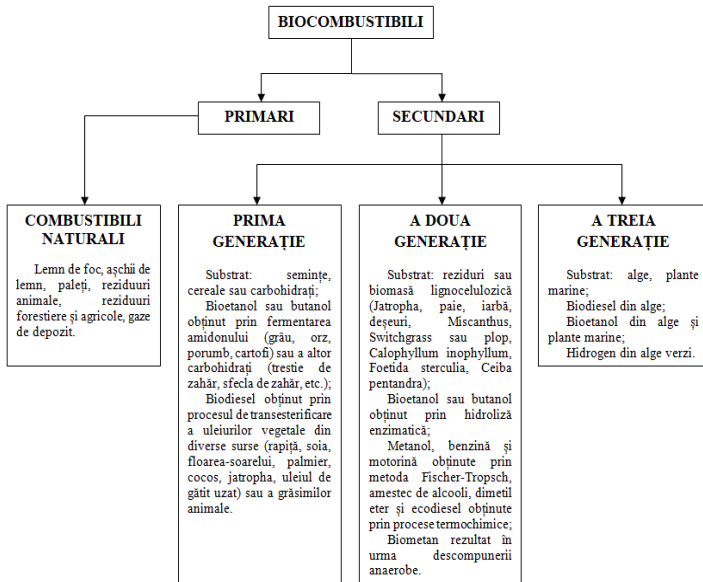


Figura I.1. Clasificarea biocombustibililor [Si'11], [No'14], [Ur'20a]

Biocombustibilii primari, naturali, nu fac obiectul tezei de doctorat.

I.3. Producția anuală de bioetanol la nivel mondial

La nivel mondial, producția bioetanol (figura I.2) se realizează în cea mai mare măsură din cereale, cum ar fi porumbul și trestia de zahăr.

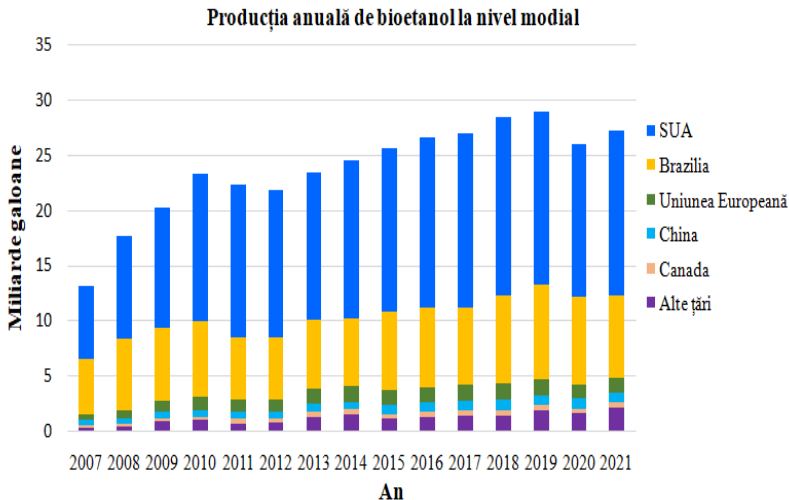


Figura I.2. Producția de bioetanol la nivel mondial exprimată în miliarde de galoane [Us'22a]

I.4. Principalele materii prime utilizate la producția de bioetanol de a doua generație

În comparație cu biocarburanții din primă generație care se obțin în mare parte din porumb sau trestie de zahăr, biocombustibilii obținuți din BLC sunt mai scumpi deoarece materialele lignocelulozice au o structură complexă și necesită un proces tehnologic specific [Le'14], [Zh'17].

Celuloza ($C_6H_{10}O_5$)_n este un carbohidrat care se găsește în biomasă agricolă și lemnoasă [Ba'11]. Este un polimer liniar format din molecule de glucoză (*D*-glucoză) ce prezintă legături β -(1,4)-glicozidice [Eb'05], [Mo'13]. Celuloza este insolubilă în apă, de aceea pentru a transforma acest polizaharid în molecule de glucoză trebuie aplicat un proces de hidroliză [Ha'05].

Lignina este al doilea cel mai abundent biopolimer al biomasei lignocelulozice, după celuloză [Bo'03]. În combinație cu hemiceluloza este distribuită în jurul fibrelor de celuloză atât în pereții celulari primari, cât și secundari (figura I.3). Este formată din trei monomeri fenilpropanolici de

bază întâlniți sub denumirea de alcool *p*-coumarilic, alcool coniferilic și alcool sinapic. Când formează împreună structura ligninei, acești monomeri poartă denumirea de unități *p*-hidroxifenil (H), guaiacol (G) și siringil (S) [No'14a], [Co'16].

Hemiceluloza este un polizaharid care conține diferite tipuri de zaharuri: cu 5 atomi de carbon (β -*D*-xiloză, α -*L*-arabinoză și ramnoză) și cu 6 atomi de carbon (β -*D*-glucoză, β -*D*-manoză și α -*D*-galactoză) [Fr'08].

Constituenții principali din reziduurile agricole, reziduurile solide municipale și diferite tipuri de iarbă sunt prezentați în tabelul I.1.

Tabel I.1. Constituenții principali din reziduurile agricole, reziduurile solide municipale și diferite tipuri de iarbă

Materie primă	Compoziție chimică (%)			Referințe bibliografice
	Celuloză	Hemiceluloză	Lignină	
Tulpini de porumb	38	26	19	[Ku'17]
Coceni de porumb	45	35	15	
Pulpă din trestie de zahăr	42	25	20	
Vârfuri de trestie de zahăr	35	32	14	[Me'12]
Vârfuri de tulpini de sorg	27	25	11	[Sa'15]
Paie sorg	32	24	13	
Pulpă din sorg dulce	34-45	18-28	14-22	
Paie de orz	31-45	27-38	14-19	
Paie de orez	38	32	12	[Ba'18]
Pleavă de orez	37	29	24	
Paie de grâu	33-40	20-25	15-20	
Bumbac / In	80-95	5-20	-	[Sa'15]
Switchgrass	40-45	30-35	12	[Li'12]
Iarbă	29-43	8-29	8-27	[Sm'19]
Frunze	15-20	80-85	0	[Ku'17]
Reziduuri industriale	50-70	12-20	6-10	[Li'12]
Reviste	40-55	25-40	18-30	[Sa'15]
Deșeuri de hârtie	65	13	1	[Ba'18]

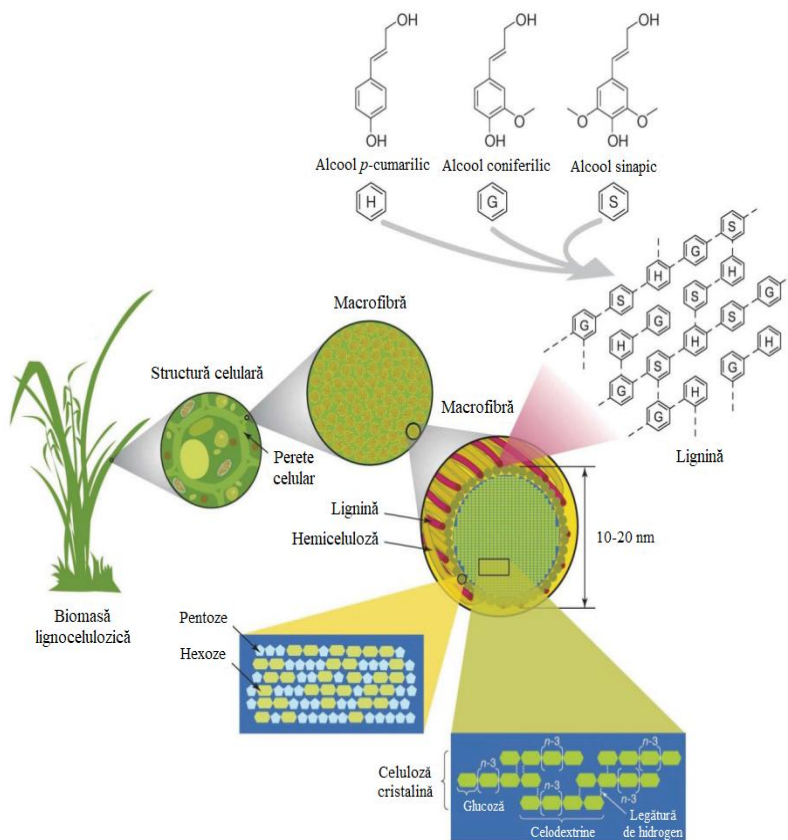


Figura I.3. Structura biomasei lignocelulozice adaptată după [Ni'16]

Capitolul II sunt descrie metodele de conversie a biomasei lignocelulozice. Materialele lignocelulozice sunt rezistente la degradarea chimică și biologică. Mai mulți factori, cum ar fi structura cristalină a celulozei, gradul de lignificare, eterogenitatea structurală și complexitatea constituenților peretelui celular sunt responsabili pentru rezistența BLC, care trebuie depășită pentru valorificarea cu succes a materiilor prime lignocelulozice [Gu'16]. Există o multitudine de tehnici de pretratare care au fost dezvoltate în ultimele decenii pentru a îmbunătăți degradarea materialelor lignocelulozice. Aceste tehnici pot fi clasificate conform figurii II.1.

II.1. Tipuri de pretratamente

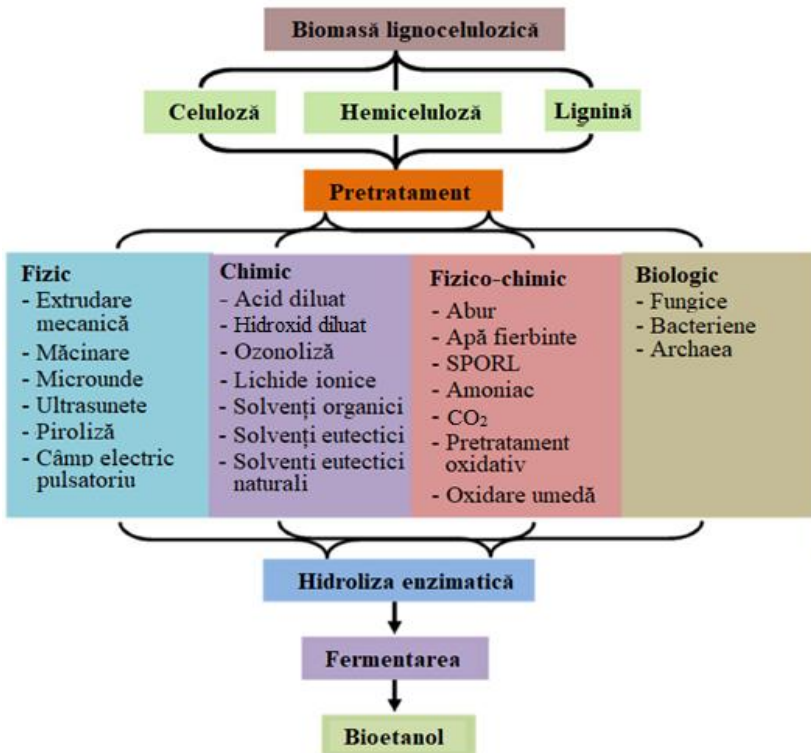


Figura II.1. Reprezentarea schematică a procesului de obținere a bioetanolului și metodele de pretratare care pot fi aplicate biomasei lignocelulozice [Tu'19]

II.2. Spălarea substratului și a hidrolizatului

Prođuși de degradare ai hexozelor și pentozelor (furfural și hidroxi-metil furfural, acizi) formați în etapa de pretratare sau hidroliză acidă au o acțiune toxică sau inhibitoare asupra hidrolizei enzimatică sau fermentării și trebuie îndepărtați sau neutralizați înainte de fermentare. Frația solidă provenită din etapa de pretratare se presează și se spală pentru îndepărtarea inhibitorilor. Opțional, în frația lichidă se introduc schimbători de ioni pentru a limita formarea hidroxidului de calciu [Pa'04]. În figura II.2 sunt reprezentați schematic produși de degradare ai hexozelor și pentozelor.

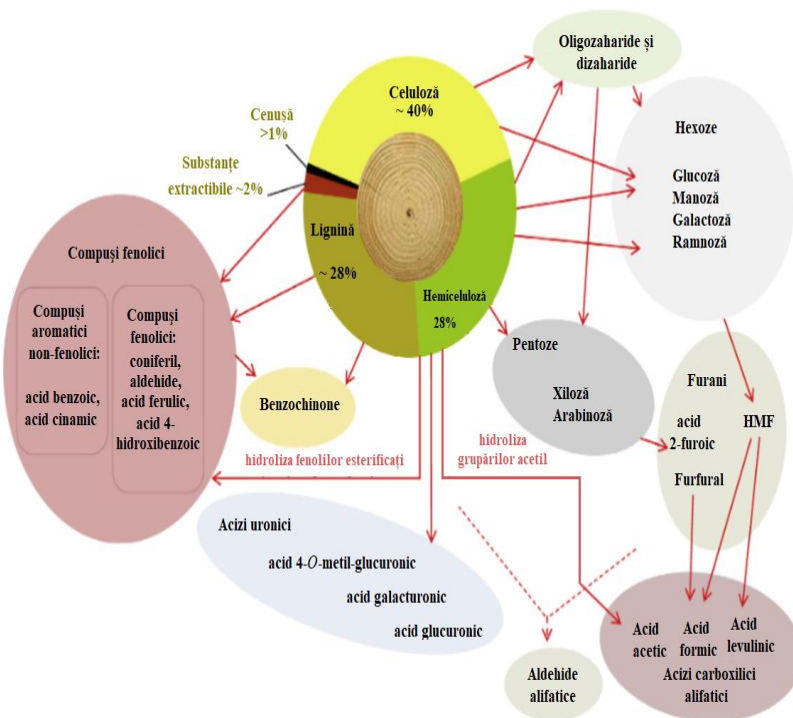


Figura II.2. Producții de degradare ai BLC rezultați în urma pretratării în condiții acide [Jö'16]

II.3. Metode de hidroliză enzimatică aplicate biomasei lignocelulozice

Celulazele sunt produse de bacterii și mucegaiuri. Acestea reprezintă un amestec de enzime care acționează sinergic asupra fibrei celulozice. Deși există mai multe posibilități, fie de producere a celulazelor în reactoare individuale, fie de achiziționare a acestora. Varianta cea mai avantajoasă din punct de vedere economic este aceea în care producerea celulazelor, hidroliza și fermentarea se desfășoară în același reactor [Pa'04]. Procedeele de hidroliză și fermentare a materialelor lignocelulozice sunt prezentate în figura II.3.

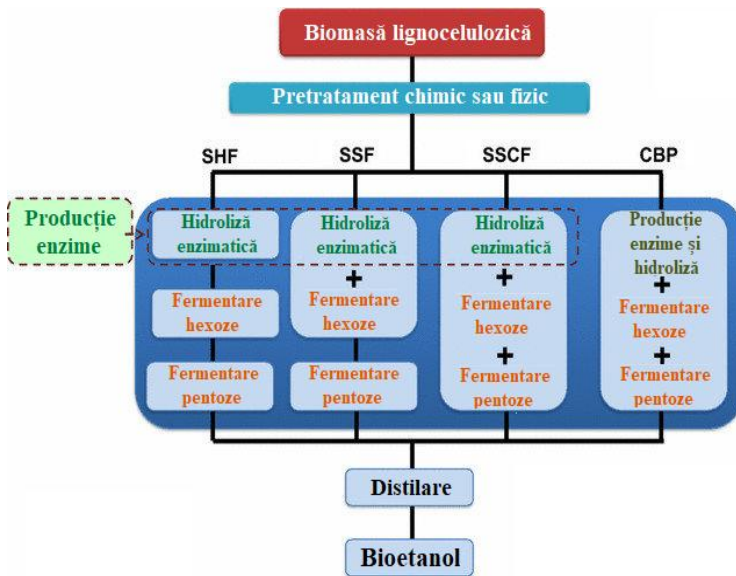


Figura II.3. Prezentarea schematică a diferitelor configurații de procesare a BLC pentru a converti lignoceluloza în bioetanol [Al'16]

Capitolul III, Materiale, echipamente și metode prezintă materialele, echipamentele și metodele de analiză care au fost utilizate pentru a studia efectul pretratamentului acid și alcalin, al hidrolizei enzimatică și al fermentației materialelor lignocelulozice (paie de grâu și rumeguș de molid). Paiele de grâu utilizate pentru obținerea de bioetanol au fost recoltate din localitatea Mitocu Dragomirnei (județul Suceava, România). Rumegușul de molid a fost utilizat ca materie primă lignocelulozică în prezentul studiu și provine din localitatea Vatra Moldoviței (județul Suceava, România). Materiile prime utilizate în acest studiu sunt prezentate în figura III.1.



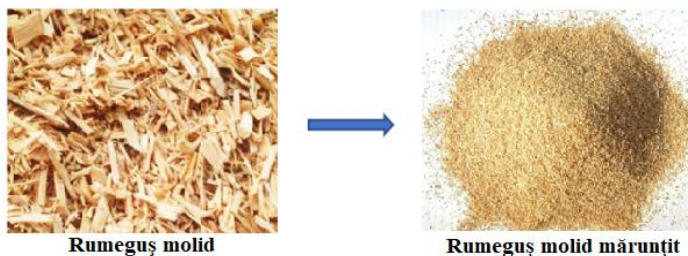


Figura III.1. Paie de grâu și rumeguș de molid având dimensiunea particulelor <1 mm

Toate analizele efectuate în cadrul tezei de doctorat s-au realizat cu aparatura existentă în dotarea laboratoarelor Facultății de Inginerie Alimentară. Microstructura paielor de grâu și a rumegușului de molid netrat, pretratată și hidrolizată s-a realizat prin intermediul microscopului electronic cu scanare (SEM) Vega II LMU (Tescan Orsay Holding, Brno, Republica Cehă). Determinarea conținutului de lignină solubilă s-a realizat cu un spectrofotometru UV-3600 UV-Vis-NIR (Shimadzu Corporation, Japonia). De asemenea, prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier, FTIR-ATR Nicolet iS20 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Statele Unite ale Americii) s-au pus în evidență modificările structurale rezultate în urma pretratării și hidrolizei enzimatice a materialelor lignocelulozice.

Determinarea polifenolilor individuali și a acizilor organici s-a realizat prin cromatografie de lichide folosind un sistem HPLC-DAD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonia) echipat cu o coloană cromatografică Kinetex® 2.6 μ m Biphenyl 100 Å, LC Column 150 $\times$ 4.6 mm, respectiv o coloană cromatografică Kinetex® 5 μ m C18 100 Å, LC Column 250 $\times$ 4.6 mm (Phenomenex, California, Statele Unite ale Americii). Conținutul de carbohidrați rezultați în urma hidrolizei enzimatice s-a determinat prin HPLC cuplat cu un detector de indice de refracție RID-10A (Shimadzu Corporation, Japonia). Separarea carbohidraților s-a realizat folosind o coloană Phenomenex Luna® Omega 3 μ m de SUGAR 100 Å HPLC 150 $\times$ 4.6 mm (Phenomenex, California, Statele Unite ale Americii).

Monitorizarea procesului de fermentație s-a realizat cu un echipament cu senzori de gaz BlueSens (BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Germania). Acești senzori au rolul de a monitoriza conținutul de CO₂, oxigen și etanol în timpul procesului de fermentație al plămezii din materialele lignocelulozice. Senzorii de CO₂ (seria H31953), oxigen (seria H31492) și etanol (seria H32132) sunt conectați la un multiplexor BACCom 12, care permite conectarea la software a unui număr de 12 senzori.

Prelucrarea și transmiterea datelor s-a realizat în timp real prin intermediul software-ului BacVis.

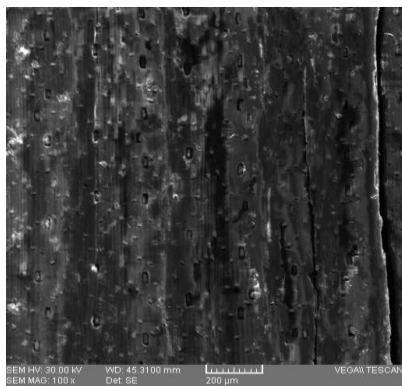
Distilatul obținut din plămezile fermentate a fost analizat prin cromatografie de gaze folosind un sistem cromatografic GC 2010 (Shimadzu Corporation, Japonia) echipat cu o coloană cromatografică Zebron ZB-Bioethanol (seria 1045817) având lungimea de 30 m, diametrul interior de 0,25 mm și grosimea filmului 1.00 μm (Phenomenex, California, Statele Unite ale Americii).

Capitolul IV, Cercetări privind obținerea bioetanolului din paie de grâu, cuprinde rezultatele studiilor efectuate asupra paielor de grâu și anume etapa de pretratare, hidroliză și fermentare. Studiul experimental a fost realizat sub forma unei comparații între pretratatamentul acid și alcalin, raport solid/lichid și doze de enzimă.

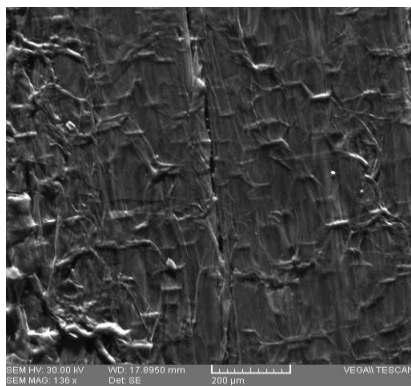
Paiete de grâu sunt formate din internoduri ($57 \pm 10\%$), noduri ($10 \pm 2\%$), frunze ($18 \pm 3\%$), paie ($9 \pm 4\%$) și ax central ($6 \pm 2\%$). Compoziția chimică a paielor de grâu este alcătuită din celuloză (34-40%), hemiceluloză (20-25%) și lignină (20%) [Ha'81] [Mo'14b];[Gh'16]; [Ch'20].

Cea mai mare deconstructurare a materialului lignocelulozic a fost obținută în cazul pretratării cu 3% (v/v) H_2SO_4 sau 3% (m/v) NaOH, în comparație cu alte concentrații. Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru pretratarea alcalină. Pretratările alcaline contribuie mai eficient la solubilizarea ligninei și la modificarea cristalinității celulozei comparativ cu pretratările cu acid diluat care măresc accesibilitatea celulozei în principal prin solubilizarea hemicelulozei [Ya'14].

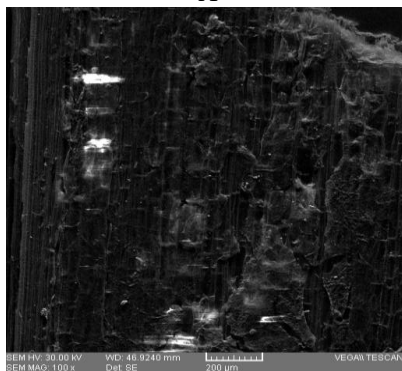
Figura IV.1D arată că structura inițială uniformă și rigidă a paielor de grâu a fost modificată după pretratare, obținându-se o structură poroasă care poate influența pozitiv acțiunea enzimatică. Această modificare a fost raportată și în alte studii [Zh'18], [Mo'19].



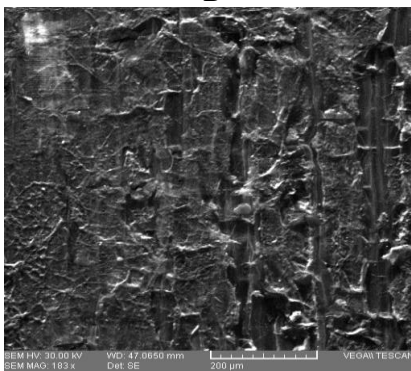
A



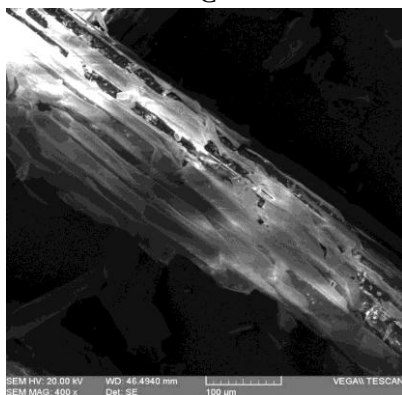
B



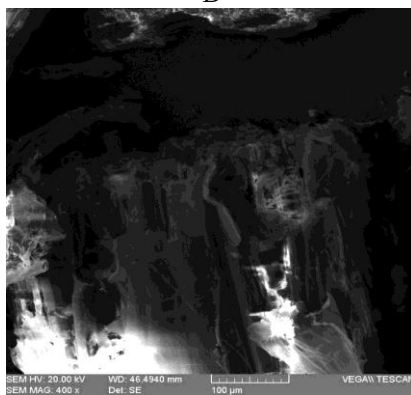
C



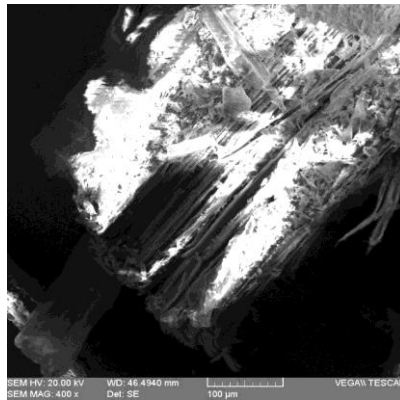
D



E

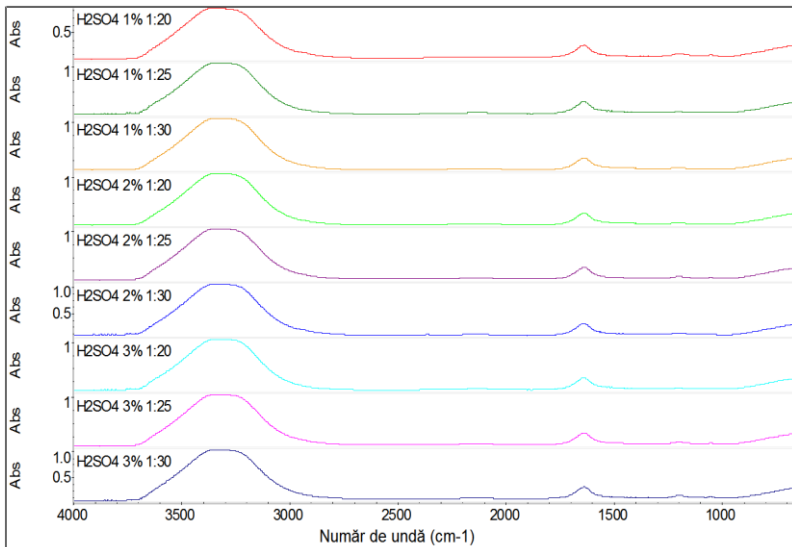


F



G

Figura IV.1. Imagini SEM pentru (A) paie de grâu netratate, paie de grâu pretratate cu H_2SO_4 (B) 1%, (C) 2%, (D) 3% (v/v) și paie de grâu pretratate cu NaOH (E) 1%, (F) 2%, (G) 3% (m/v)
[Microscop SEM TESCAN Vega II LMU]



A

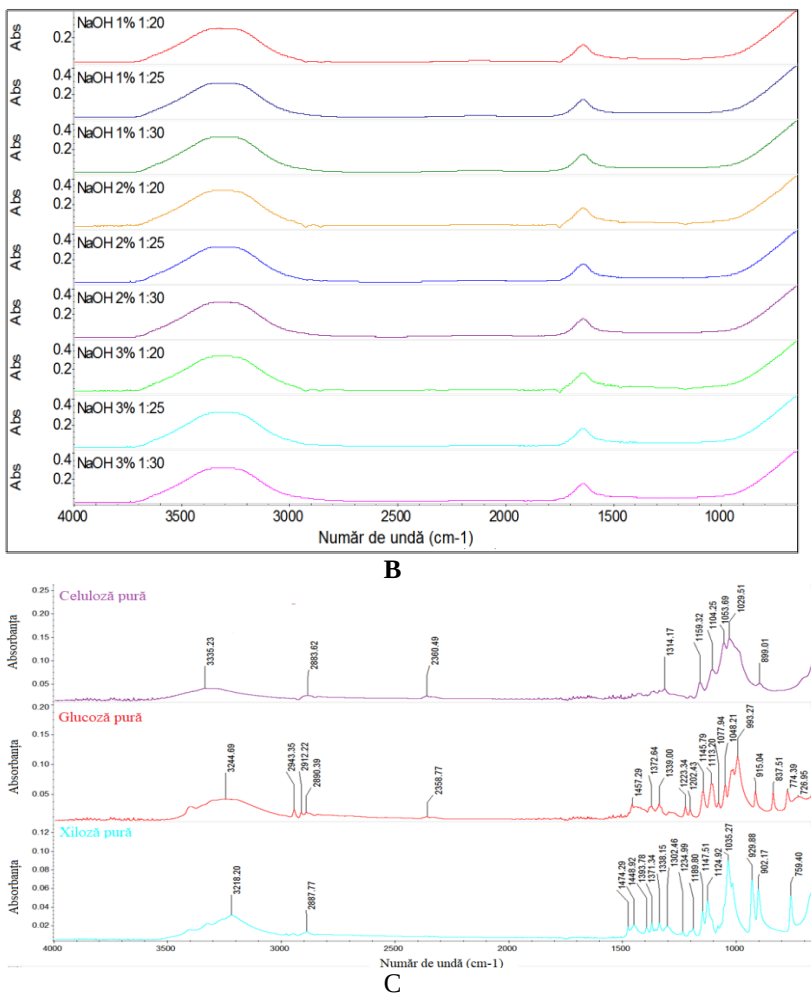


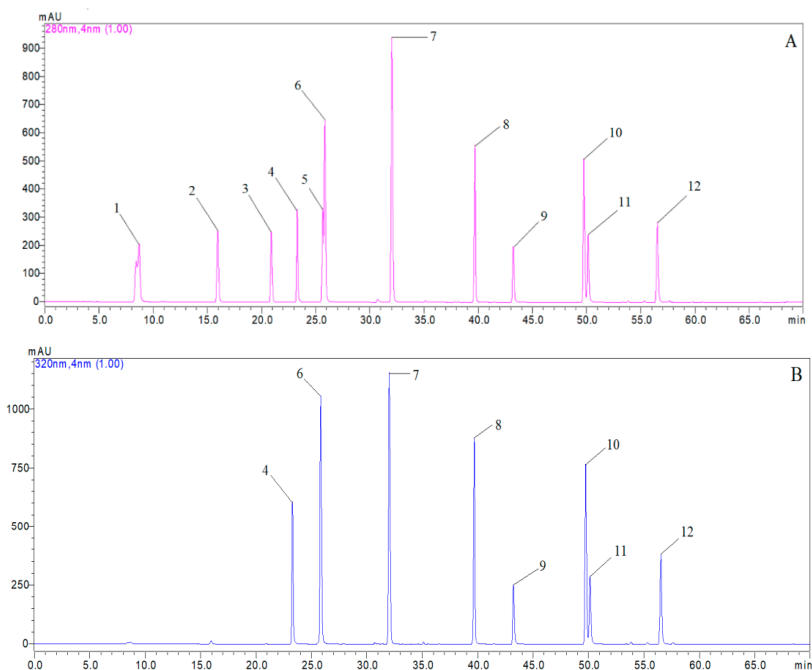
Figura IV.2. Spectrele FTIR-ATR ale fracției lichide după pretratarea acidă cu 1, 2 și 3% (v/v) H_2SO_4 (A) și pretratare alcalină cu 1, 2 și 3% (m/v) NaOH (B) în comparație cu standardele de celuloză, xiloză și glucoză (C) [Ur'20d]

După cum se poate observa în figura IV.2, schimbările chimice ale fracției lichide a probei rezultate în urma pretratamentului cu acid sulfuric și hidroxid de sodiu au fost similare, indiferent de volumul de acid/hidroxid

utilizat și de raportul S/L și au inclus o bandă mare de absorbție în jurul valorii de 3400 cm^{-1} care corespunde vibrațiilor de întindere ale legăturii O–H, o bandă la 1640 cm^{-1} atribuită legăturilor C=O din grupările alchil ale lanțurilor laterale de lignină [Li'19] și câteva benzi mici în jurul valorii de 1200 și 1050 cm^{-1} , care sunt determinate de vibrațiile de întindere ale C–O din structura celulozei și hemicelulozei [Ho'19].

Paiele de grâu conțin o gamă largă de compuși fenolici individuali (cafeic, *p*-cumaric, 4-hidroxibenzoic, protocatecuic, clorogenic, acid vanilic etc.). Fenolii sunt compuși inhibitori pentru microorganismele fermentative și celulae în procesul de obținere a bioetanolului [Ol'16].

În timpul pretratării, compușii fenolici sunt îndepărtați din materialul lignocelulozic din cauza acțiunii acidului care duce la ruperea legăturilor dintre polizaharide și polifenoli [Ch'18]. Cromatogramele HPLC-DAD obținute prin analiza compușilor fenolici sunt prezentate în figura IV.3.



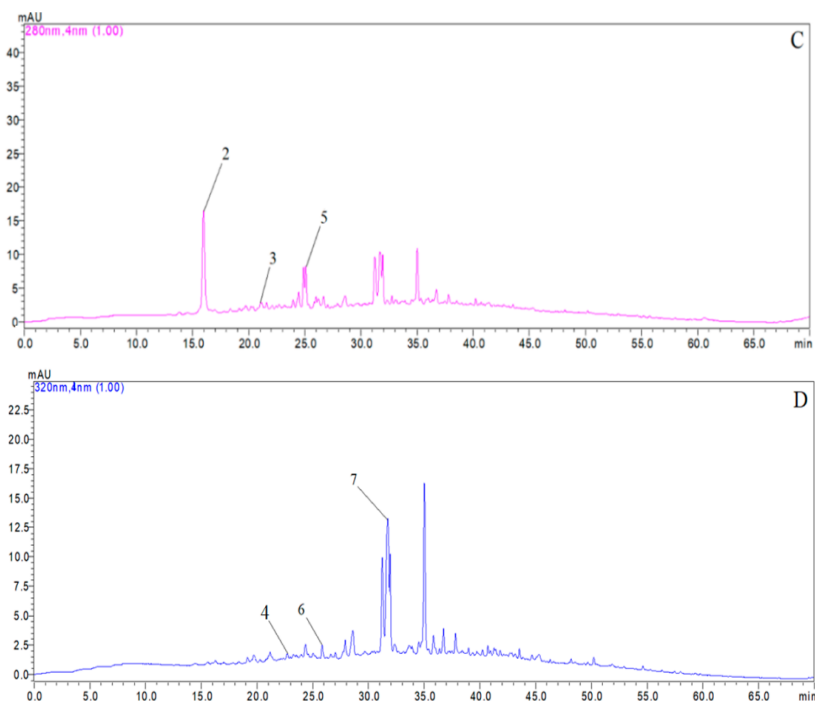
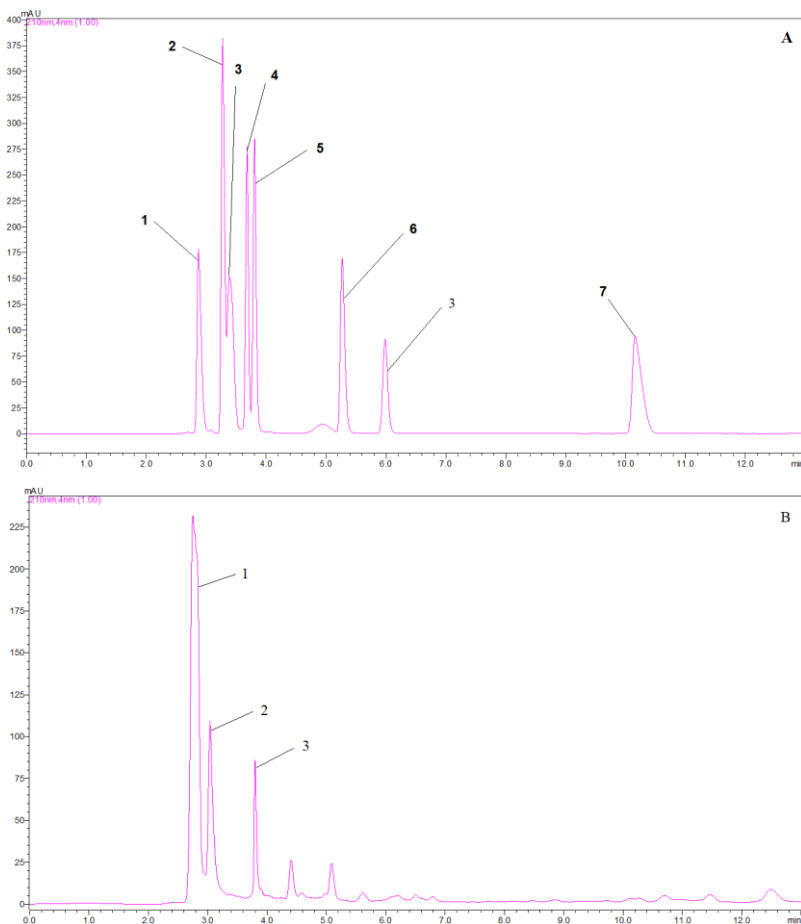


Figura IV.3. HPLC-DAD – cromatogramă la 280 nm (A) și 320 nm (B) pentru standard de acid galic – peak 1 (8,69 min), acid protocatecuic – peak 2 (15,953 min), acid 4-hidroxibenzoic – peak 3 (20,886 min), acid cafeic – peak 4 (23,277 min), acid vanilic – peak 5 (25,631 min), acid clorogenic – peak 6 (25,831 min), acid *p*-cumaric – peak 7 (32,011 min), acid rosmarinic – peak 8 (39,69 min), miricetină – peak 9 (43,216 min), luteolină – peak 10 (49,737 min), quercetină – peak 11 (50,128 min) și kaempferol – peak 12 (56,52 min) și (C-D) conținutul de compuși fenolici în paiele de grâu.

Prezența și cantitatea de acizi organici depinde de natura materialului și de condițiile pretratării cu solvent. Factorii cu influență pozitivă semnificativă asupra formării acizilor organici sunt pH-ul ridicat și pretratarea acidă care implică riscul producerii de furaldehide (FF și HMF) și acizi alifatici (acid formic și acetic) [To'14].

În această lucrare au fost analizați acizii organici din probe de paie de grâu pretratate cu H_2SO_4 de diferite concentrații (1, 2 și 3% (v/v)) (figura IV.4) și s-a observat că cel mai mare conținut de acid acetic ($0,94 \pm 0,01$

mg/g) a rezultat la o concentrație de 3% H_2SO_4 (v/v) și raport S/L de 1:30, iar cele mai scăzute valori ale acidului acetic ($0,40 \pm 0,02$ mg/g) s-au înregistrat atunci când pretratamentul a fost realizat cu 1% H_2SO_4 (v/v) și raport S/L de 1:30.



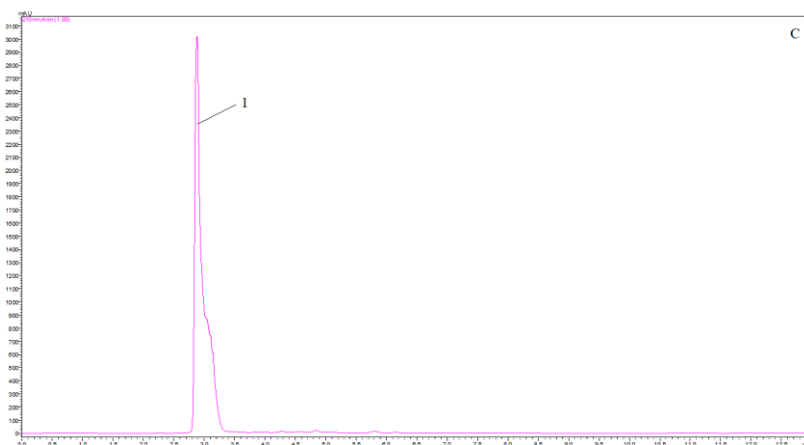


Figura IV.4. Cromatograme obținute cu HPLC-DAD pentru mixul standard de acizi organici (A) și pentru paie de grâu care au fost pretratate cu H_2SO_4 3 % (v/v) (B), respectiv cu NaOH 3 % (m/v) (C). Acid gluconic – peak 1 (2,85 min), acid formic – peak 2 (3,26 min), acid lactic – peak 3 (3,661 min), acid acetic – peak 4 (3,78 min), acid succinic – peak 5 (5,30 min), acid propionic – peak 6 (5,92 min), acid butiric – peak 7 (10,41 min)

Pentru analiza conținutului de glucide din paie de grâu s-a utilizat design-ul Box Behnken bazat pe metodologia suprafețelor de răspuns cu reprezentarea valorilor experimentale ale variabilelor independente în vederea identificării condițiilor optime pentru obținerea celui mai mare randament de carbohidrați. În figura IV.5 sunt prezentate graficele 3D obținute pentru conținutul total de carbohidrați, pentru probele care au fost pretratate cu H_2SO_4 1, 2, 3 % (v/v) și NaOH 1, 2, 3 % (m/v).

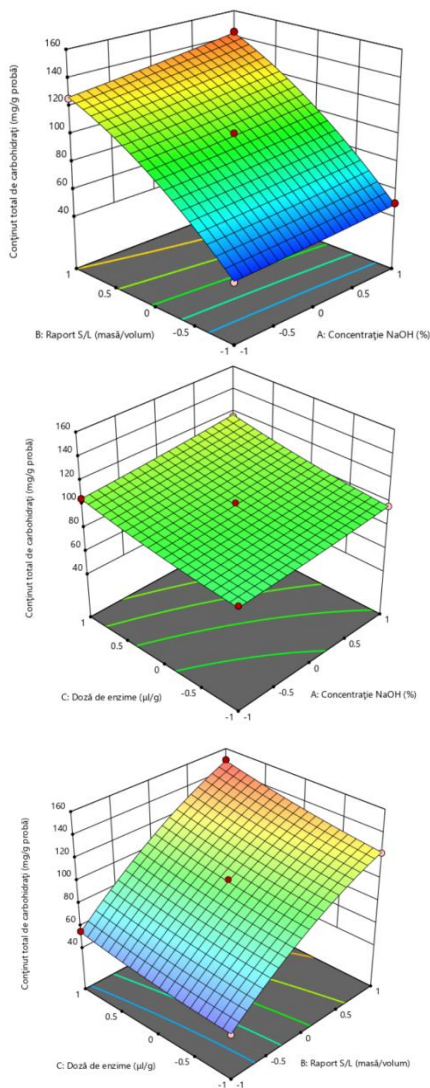


Figura IV.5. Reprezentare grafică 3D a influenței condițiilor de hidroliză enzimatică asupra conținutului total de carbohidrați din paie de grâu pretratate cu hidroxid de sodiu

După inocularea plămezii celulozice cu drojdia *Saccharomyces cerevisiae* (DistillaMax SR) se poate observa pe baza graficului generat de software-ul BACVis că procesul de fermentație a început. Fermentația maximă s-a înregistrat la aproximativ 12-13 ore după inocularea drojdiei, unde consumul de O_2 (de la 22% volum inițial la cca. 15,1% vol.) și carbohidrați a fost cel mai mare, iar eliberarea de CO_2 a atins cel mai mare nivel (cca. 26,3% vol.); în această etapă conținutul de bioetanol a fost de cca. 0,853% vol. După 12-13 ore de la maximul procesului de fermentație s-a observat că spre finalul fermentației concentrația de alcool etilic a crescut cu aproximativ 0,4% vol. Concentrația maximă de bioetanol obținută în fază gazoasă din procesul de fermentație în condițiile prezentate a fost de 1,20% (v/v) (figura IV.6).

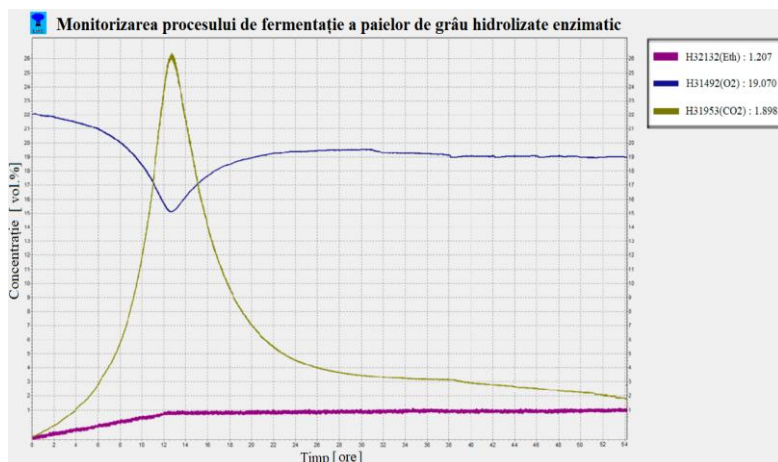
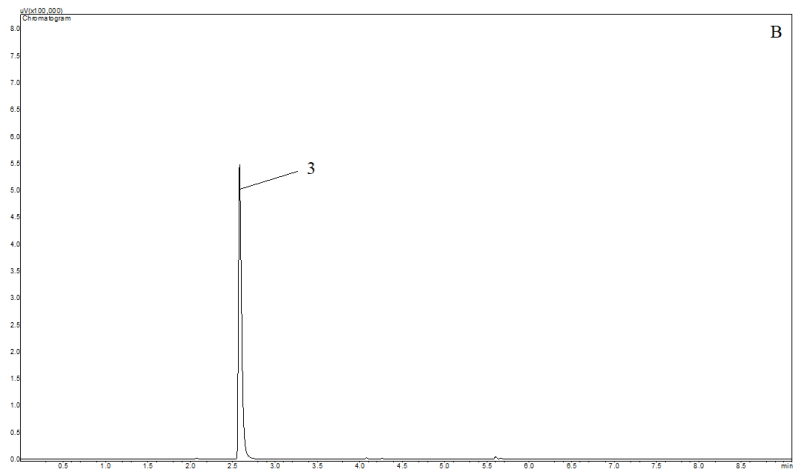
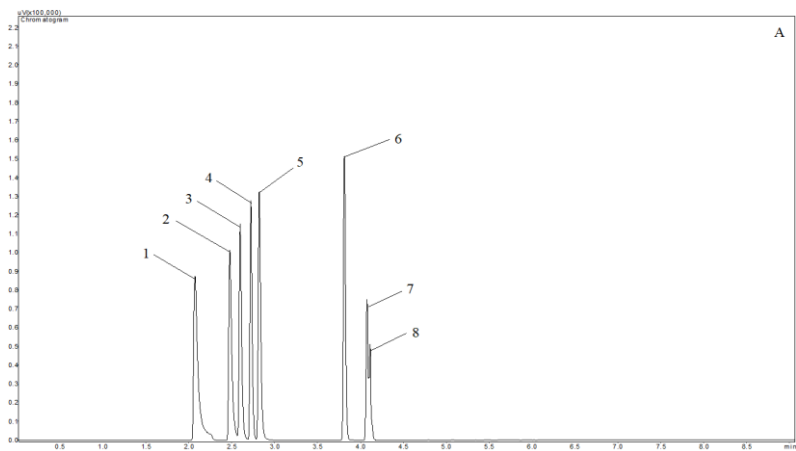


Figura IV.6. Evoluția concentrațiilor de CO_2 , O_2 și etanol în timpul procesului de hidroliză și fermentare simultană [Ur'20]

La finalul etapei de fermentație, s-a efectuat distilarea, iar apoi distilatul a fost analizat prin cromatografie în gaze. Calculul concentrației de bioetanol a fost efectuat pe baza unui standard format din 8 alcooli. Cromatogramele obținute sunt prezentate în figura IV.7.



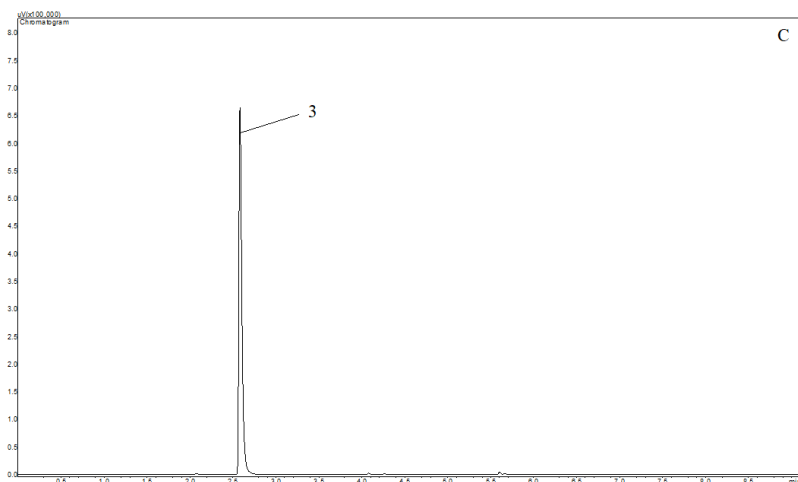
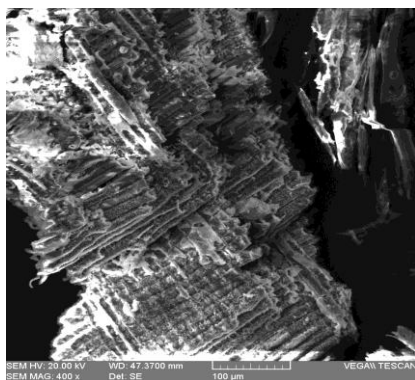


Figura IV.7. Cromatograme obținute prin GC , pentru mixul standard de alcooli (A), paie de grâu pretratate cu H_2SO_4 (B), respectiv NaOH (C): acetaldehidă – peak 1 (3,73 min), metanol – peak 2 (4,235 min), etanol – peak 3 (4,771 min), acetona – peak 4 (5,298 min), 2-propanol (izopropanol) – peak 5 (5,921 min), acetonitril – peak 6 (6,233 min), metil etil cetonă – peak 7 (6,77 min), acetat etilic – peak 8 (9,886 min)

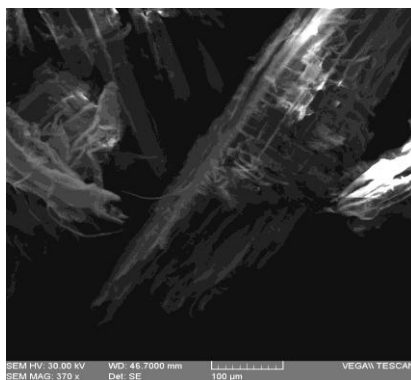
Randamentul de bioetanol, calculat prin raportarea concentrației de bioetanol la concentrația de zaharuri fermentescibile a fost cuprins între 12,30 și 14,51% în cazul pretratamentului cu H_2SO_4 și între 14,96 și 15,54% în cazul pretratamentului cu NaOH.

Capitolul V, Cercetări privind obținerea bioetanolului din rumeguș de molid, cuprinde rezultatele studiilor efectuate asupra rumegușului de molid și anume etapa de pretratare, hidroliză și fermentare. Studiul experimental a fost realizat sub forma unei comparații între pretratamentul acid sau alcalin, a dozelor de enzimă etc.

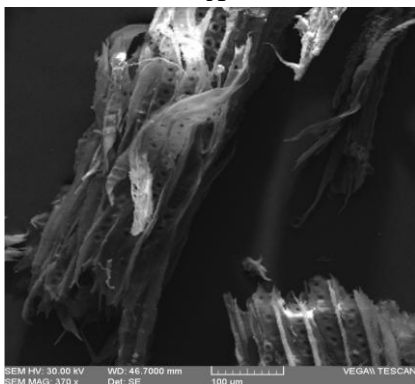
Analiza prin microscopie electronică cu scanare (SEM) a fost utilizată pentru a investiga modificările în structura probelor de rumeguș după pretratarea acidă și alcalină. Din imaginile obținute (figura V.1) se pot observa diferențe semnificative ale compoziției structurale a materialului datorate pretratării.



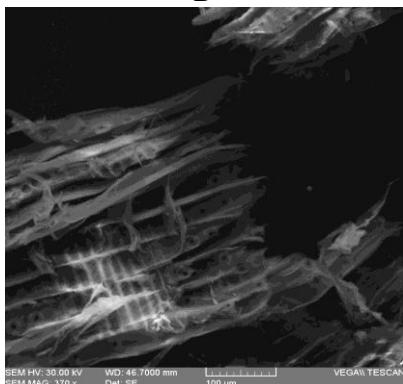
A



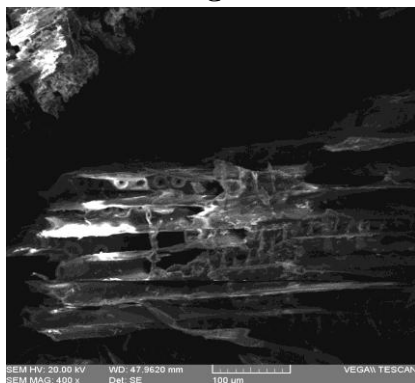
B



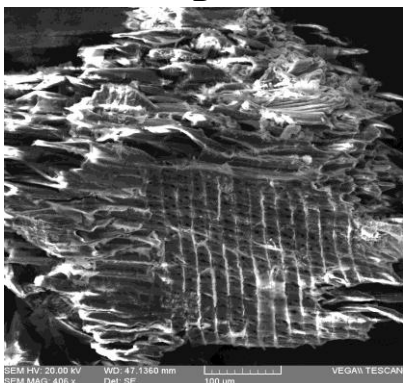
C



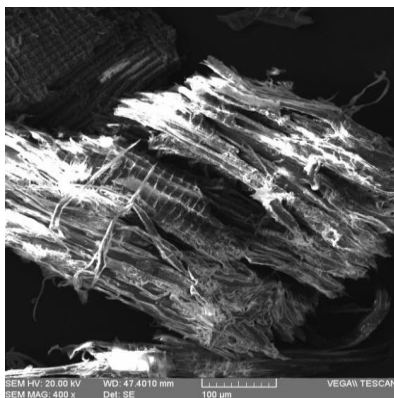
D



E



F



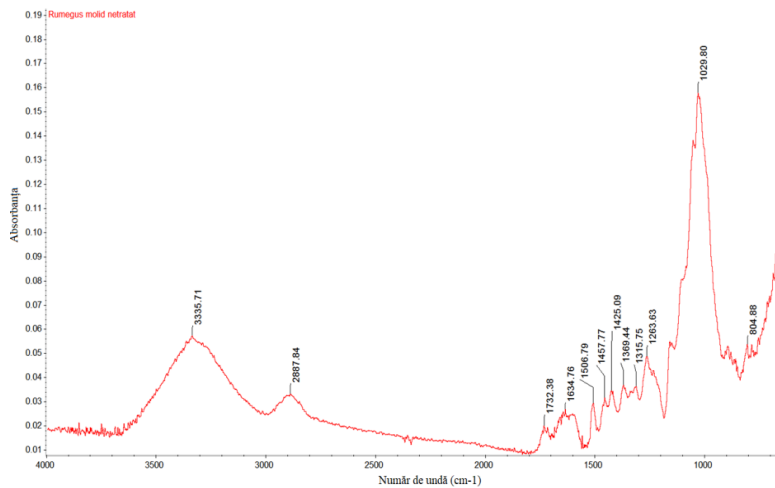
G

Figura V.1. Imagini SEM pentru (A) rumegușul de molid netratat, rumegușul de molid pretratate cu H_2SO_4 (B) 1%, (C) 2%, (D) 3% (v/v) și paie de grâu pretratate cu NaOH (E) 1%, (F) 2%, (G) 3% (m/v)
[Microscop SEM TESCAN Vega II LMU]

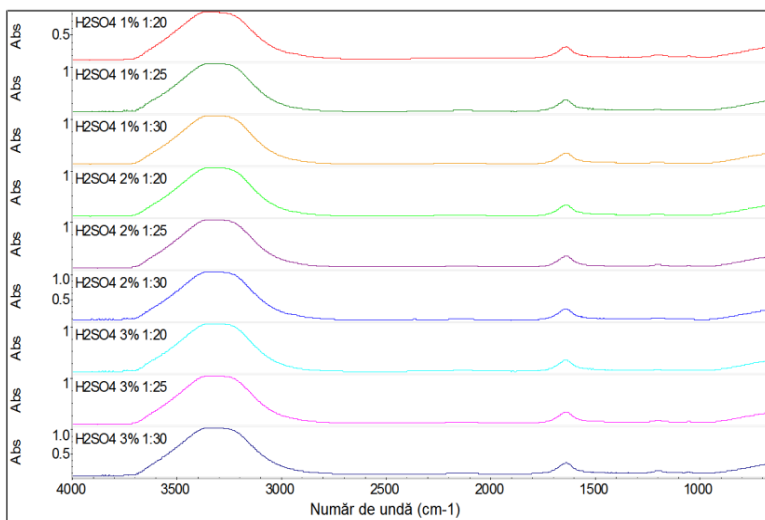
Investigarea modificărilor structurale și chimice care apar în structura rumegușului pretrat în mediu acid sau alcalin a fost realizată utilizând spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier cu reflectanță totală atenuată.

În figura V.2. sunt prezentate spectrele suprapuse, respectiv separate, ale rumegușului de molid netratat (A), ale probelor de rumeguș pretratate cu acid sulfuric (B) sau hidroxid de sodiu (C) și ale celulozei, glucozei și xilozei (D). Astfel, se identifică principalele grupări funcționale care constituie materialul lignocelulozic, observându-se că regiunea de „amprentă” a spectrului este cuprinsă între 1800 și 800 cm^{-1} [Be'22].

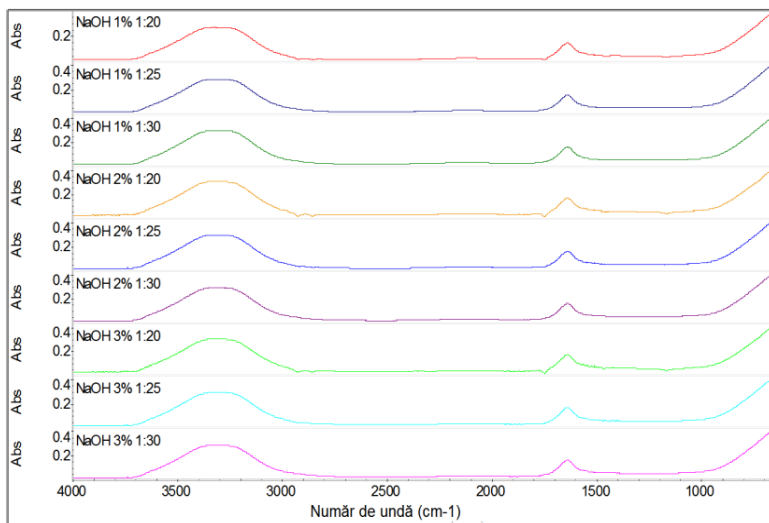
Diferențe au fost observate, de asemenea, în cazul benzii de absorbție din jurul valorii 1028 cm^{-1} , care a prezentat intensitate mai mare în urma pretratamentului cu acid sulfuric în comparație cu cel cu hidroxid de sodiu și proba de rumeguș de molid netratată. Banda de absorbție din jurul valorii 890 cm^{-1} , atribuită unor vibrații în legătura glicozidică a celulozei, nu a fost observată în spectrul probelor pretratate, iar acest lucru indică degradarea celulozei [Ra'20]. Prin urmare, analiza prin ATR-FTIR a confirmat că pretratamentul aplicat rumegușului de molid a determinat modificări în structura peretelui celular vegetal, având ca rezultat degradarea, respectiv modificarea conținutului de lignină, hemiceluloză și celuloză.



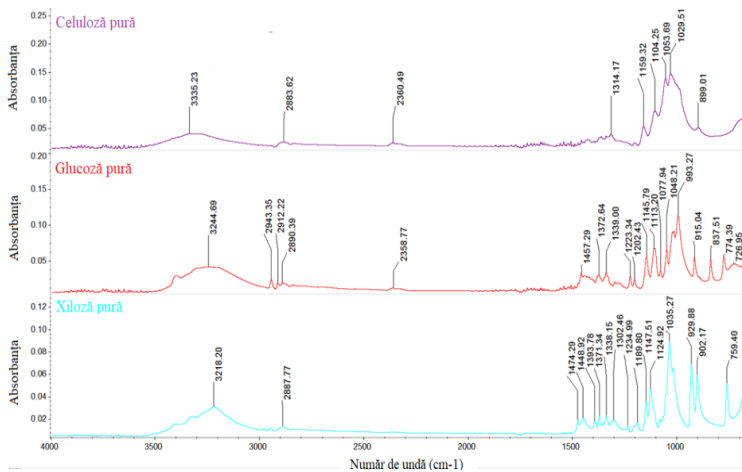
A



B



C



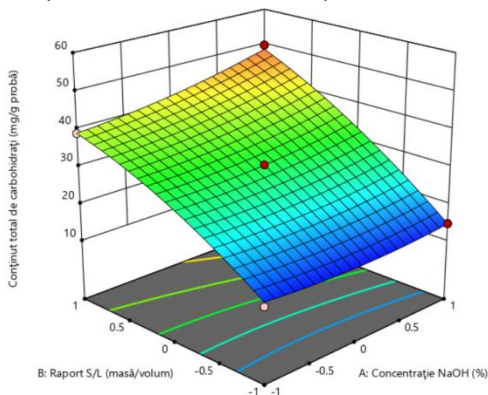
D

Figura V.2. Spectre FTIR-ATR ale rumeгуşului de molid netratat (A), fracţiei lichide după pretratamentul cu acid sulfuric (B) şi hidroxid de sodiu (C) şi ale celulozei, glucozei şi xilozei (D)

Odată cu creșterea concentrației de acid sulfuric sau hidroxid de sodiu crește concentrația de compuși fenolici în fracția lichidă din rumeguș de molid pretrat. Aceasta înseamnă că pretratamentul a dus la destructurarea ligninei, efectul fiind mai pronunțat în cazul pretratamentului alcalin, în cazul căruia s-a determinat un conținut mult mai mare de compuși fenolici. Studii anterioare au arătat că în condiții extreme de pretratare, conținutul de compuși fenolici din fracția lichidă crește. În timpul pretratării biomasei cu acid are loc depolimerizarea ligninei prin fragmentarea catalizată acidă a legăturilor eterice β -O-4, rezultând fragmente de lignină cu grupări funcționale fenolice libere [Na'16], [Pi'17], [Pu'13].

HPLC-DAD a fost utilizată ca metodă pentru analiza acizilor organici (acid gluconic, acid acetic, acid formic, acid succinic, acid propionic, acid lactic și acid butiric) rezultați în urma etapei de pretratare a probelor de rumeguș de molid cu H_2SO_4 și NaOH de diferite concentrații. Potrivit rezultatelor obținute pentru probele analizate se poate observa că odată cu creșterea concentrației de acid sulfuric sau hidroxid de sodiu crește concentrația de compuși fenolici în fracția lichidă. Aceasta înseamnă că pretratamentul a dus la destructurarea ligninei, efectul fiind mai mare în cazul pretratamentului alcalin.

Pentru analiza conținutului total de carbohidrați din rumegușul de molid hidrolizat după ce a fost pretratată cu hidroxid de sodiu s-a utilizat un design Box-Behnken bazat pe metodologia suprafețelor de răspuns cu reprezentarea valorilor experimentale ale variabilelor independente în vederea identificării condițiilor optime pentru obținerea celui mai mare randament de carbohidrați. În figura V.3 sunt prezentate graficele 3D obținute pentru conținutul total de carbohidrați.



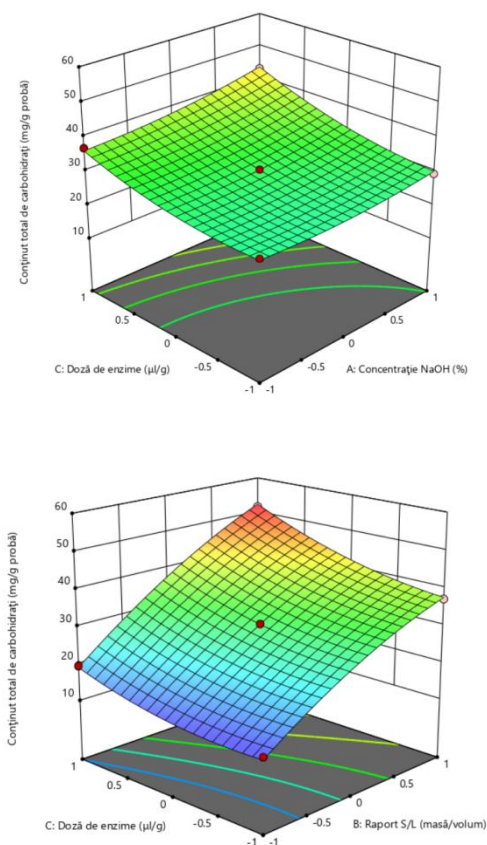


Figura V.3. Reprezentare grafică 3D a influenței condițiilor de hidroliză enzimatică asupra conținutului total de carbohidrați al rumegușului de molid după ce a fost pretratată cu hidroxid de sodiu

Din figura V.3 rezultă că cel mai mare conținut total de carbohidrați a fost obținut atunci când concentrația, doza de enzime și raportul S/L au fost la cel mai înalt nivel. În urma hidrolizei enzimatică, nu au fost detectați acizi organici și compuși fenolici din totalul de 7 acizi organici și 12 compuși fenolici individuali studiați. Acest lucru poate fi atribuit spălării eficiente a rumegușului.

Activitatea drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* (DistillaMax SR) nu a fost inhibată de prezența acidului acetic sau a altor acizi organici, deoarece aceștia nu a fost identificați în probele analizate după hidroliza enzimatică.

După finalizarea etapei de fermentației s-a realizat distilarea plămezilor de rumeguș de molid, iar apoi distilatul a fost analizat prin cromatografie de gaze. Calculul concentrației de bioetanol s-a efectuat pe baza unui standard format din 8 alcooli (acetaldehidă, metanol, etanol, acetonă, 2-propanol, acetonitril, metil etil cetonă și acetat etilic).

Randamentul de bioetanol, calculat prin raportarea concentrației de bioetanol la concentrația de zaharuri fermentescibile a fost cuprins între 10,93 și 12,55% în cazul pretratamentului cu H_2SO_4 și între 13,97 și 14,27% în cazul pretratamentului cu NaOH.

Capitolul VI, Concluzii generale prezintă sinteza analitică a cercetărilor realizate în această teză de doctorat.

În teza de doctorat denumită „**Cercetări privind obținerea bioetanului din deșeuri vegetale**” s-a urmărit ca studiile teoretice și cele experimentale efectuate să contribuie la nivelul actual de dezvoltare și de cunoaștere în domeniul obținerii de bioetanol. Această teză de doctorat subliniază importanța și potențialul de valorificare a unor deșeuri rezultate în urma recoltării cerealelor sau din exploatarea forestieră.

Din studiile teoretice și cercetările experimentale descrise în capitolele IV și V, precum și din concluziile parțiale prezentate în încheierea fiecărui capitol rezultă următoarele concluzii generale:

- Având în vedere că din agricultură și din sectorul forestier se generează o cantitate imensă de materiale lignocelulozice este ideal ca în loc să fie eliminate în mediul înconjurător să fie transformate în bioetanol de a doua generație. Eficiența materiilor prime lignocelulozice depinde în principal de disponibilitatea și compoziția acestora (celuloză, hemiceluloză și lignină). Se pot obține randamente mari de carbohidrați, respectiv bioetanol de a doua generație doar în cazul în care asupra BLC sunt aplicate diferite pretratamente descrise în literatura de specialitate.
- Întrucât MLC au o structură complexă, aceasta trebuie mai întâi fracționată cât mai mult posibil, iar acest lucru se poate face doar prin alegerea corectă a tehnicii de pretratare dintre toate cele disponibile, care includ metode biologice, mecanice, chimice și diverse metode combinate. Nu poate fi aleasă o metodă ideală care să poată fi aplicată pentru toate tipurile de biomasă lignocelulozică; alegerea

- metodei de pretratare depinde în cea mai mare parte de tipul de BLC și, prin urmare, fiecare metodă de pretratare are propriile efecte asupra fracțiilor de celuloză, hemiceluloză și lignină.
- Procesul de hidroliză enzimatică prezintă impedimente în producția eficientă de bioetanol din cauza costului ridicat al multor enzime, precum și a proprietăților inhibitoare ale compușilor care reduc eficiența producției de glucoză. Astfel, sunt necesare cercetări suplimentare și noi abordări pentru a crește conversia celulozei în glucoză prin găsirea de structuri adecvate de biomasă lignocelulozică care pot îmbunătăți producția de bioetanol.
 - În cadrul cercetărilor experimentale s-au utilizat echipamente de analiză din dotarea laboratoarelor Facultății de Inginerie Alimentară. Metodele de analiză utilizate au stat la baza studierii și optimizării efectului condițiilor pretratamentului fizico-chimic (măcinare și pretratament cu H_2SO_4 și NaOH , concentrații de 1, 2 și 3%) și hidrolizei enzimactice (cu preparate enzimactice Celluclast 1.5L și Viscozyme L) asupra conținutului de zaharuri fermentescibile din paie de grâu și rumeguș de molid. De asemenea, s-au descris metodele de determinare a conținutului individual de compuși fenolici și acizi organici din materialele lignocelulozice analizate în urma pretratamentului acid și alcalin, s-a monitorizat procesul de fermentație și în final s-a determinat concentrația de bioetanol din distilat.
 - Pe baza rezultatelor obținute în cazul utilizării paielor de grâu ca material lignocelulozic, prin analiza SEM s-au evidențiat modificări semnificative în cazul pretratamentului cu 3% H_2SO_4 (v/v) și a celui cu 3% NaOH (m/v).
 - Prin determinarea conținutului de compuși fenolici și a celui de acizi organici în urma pretratamentului acid/alcalin a paielor de grâu s-a identificat că cea mai mare degradare a materialului lignocelulozic s-a realizat în cazul pretratării cu 3% NaOH (m/v), în comparație cu alte concentrații ale aceluiași hidroxid și cu pretratarea cu 3% H_2SO_4 (v/v).
 - Investigarea prin FTIR-ATR a modificărilor pe care le prezintă grupările funcționale a evidențiat reducerea intensității benzilor caracteristice celulozei, hemicelulozei și ligninei la doze de enzime și rapoarte S/L crescute, confirmând astfel eficiența pretratării și a hidrolizei enzimactice.
 - Prin hidroliza enzimatică a paielor de grâu pretratate cu H_2SO_4 și cu NaOH cel mai mare conținut de carbohidrați a fost identificat în

- paiele de grâu pretratate cu 3% (v/v) H_2SO_4 , raport S/L de 1:30 (masă/volum) și o doză de enzime de 90 $\mu\text{l/g}$. În cazul hidrolizei enzimatică a paielor de grâu pretratate cu NaOH, cele mai mari concentrații de carbohidrați au fost obținute la o concentrație de 3% (m/v) NaOH, raport S/L de 1:30 (masă/volum) și doză de enzime de 90 $\mu\text{l/g}$.
- Randamentul de bioetanol, exprimat ca raport între concentrația de bioetanol și concentrația de zaharuri fermentescibile, a fost cuprins între 12,30 și 14,51% în cazul pretratamentului cu H_2SO_4 și între 14,96 și 15,54% în cazul pretratamentului cu NaOH. Cele mai bune valori s-au obținut astfel prin utilizare unei doze de enzime de 90 $\mu\text{l/g}$, iar cel mai eficient pretratament a fost cel alcalin.
 - În cadrul cercetărilor experimentale efectuate pe rumegușul de molid prin analiza SEM s-au evidențiat modificări semnificative în cazul pretratamentului cu 3% H_2SO_4 (v/v) raport S/L de 1:30 și a celui cu 3% NaOH (m/v), raport S/L de 1:30. Pentru proba netratată s-a observat o structură rigidă, care după aplicarea pretratamentului s-a modificat semnificativ, structura peretelui celular devenind dezordonată și poroasă.
 - Cele mai mari modificări în structura și compoziția rumegușului de molid au avut loc în cazul pretratării cu 3% NaOH (m/v), în comparație cu alte concentrații ale aceluiași hidroxid și cu pretratarea cu 3% H_2SO_4 (v/v), deoarece în aceste probe s-a identificat cel mai mare conținut de compuși fenolici și acizi organici, care sunt produși rezultați prin destructurarea ligninei și alte transformări pe care le suferă componentele MLC în urma unui pretratament adecvat.
 - Pe baza analizei FTIR-ATR a rumegușului de molid pretrat s-a pus în evidență reducerea intensității benzilor caracteristice ligninei și s-au observat benzi de absorbție pronunțate care sunt similare cu cele obținute pentru celuloza pură, fiind asociate vibrațiilor în legăturile glicozidice din structura acesteia.
 - Rezultatele obținute pentru conținutul de carbohidrați din fracția lichidă rezultată după hidroliza enzimatică confirmă, la fel ca în cazul paielor de grâu, că cel mai bun randament de zaharuri fermentescibile s-a obținut la o concentrație de 3% (m/v) NaOH, raport S/L de 1:30 (masă/volum) și doză de enzime de 90 $\mu\text{l/g}$.
 - Randamentul de bioetanol obținut în urma utilizării rumegușului de molid ca BLC, exprimat ca raport între concentrația de bioetanol și concentrația de zaharuri fermentescibile, a fost cuprins între 10,93 și 12,55% în cazul pretratamentului cu H_2SO_4 și între 13,97 și 14,27%

- în cazul pretratamentului cu NaOH. Cele mai bune valori s-au obținut astfel prin utilizarea unei doze de enzime de 90 μ l/g, iar cel mai eficient pretratament a fost cel alcalin.
- Pentru modelarea experimentală și optimizarea condițiilor pretratamentului și hidrolizei enzimaticice s-a utilizat un design Box-Behnken bazat pe metodologia suprafețelor de răspuns cu reprezentarea valorilor experimentale ale variabilelor independente în vederea identificării condițiilor optime pentru obținerea celui mai mare randament de carbohidrați. Din rezultatele obținute se observă că valorile determinate pentru conținutul de carbohidrați al probelor de paie de grâu hidrolizate și probelor de rumeguș de molid hidrolizat au fost mai mari în cazul pretratamentului cu hidroxid de sodiu în comparație cu pretratamentul acid.
 - Analiza componentelor principale demonstrează că randamentul de bioetanol, conținutul de xiloză, fructoză, glucoză și conținutul total de carbohidrați au avut o influență semnificativă asupra diferențierii probelor de paie de grâu și rumeguș de molid analizate. Proba de paie de grâu pretratată cu hidroxid de sodiu obținută în condiții optime a fost corelată cu randamentul de bioetanol, conținutul de fructoză și conținutul total de carbohidrați. Pentru probele de rumeguș de molid pretratate s-a identificat o variație mică a randamentului de bioetanol, conținutului de xiloză, fructoză, glucoză și conținutului total de carbohidrați.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [Ab'16] Abdella, A., Mazeed, T. E. S., El-Baz, A. F., & Yang, S. T. (2016). Production of β -glucosidase from wheat bran and glycerol by *Aspergillus niger* in stirred tank and rotating fibrous bed bioreactors. *Process Biochemistry*, 51(10), 1331-1337.
- [Am'17] Amin, F. R., Khalid, H., Zhang, H., U Rahman, S., Zhang, R., Liu, G., & Chen, C. (2017). Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Amb Express*, 7(1), 72.
- [As'19] Ascencio, J. J., Chandel, A. K., Philippini, R. R., & Da Silva, S. S. (2019). Comparative study of cellulosic sugars production from sugarcane bagasse after dilute nitric acid, dilute sodium hydroxide and sequential nitric acidsodium hydroxide pretreatment. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-10.
- [Ba'18] Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., & Kalita, E. (2018). Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*, 6, 141.
- [Be'22] Ben Atallah, I., Antonopoulou, G., Ntaikou, I., Soto Beobide, A., Dracopoulos, V., Mechichi, T., & Lyberatos, G. (2022). A Comparative Study of Various Pretreatment Approaches for Bio-Ethanol Production from Willow Sawdust, Using Co-Cultures and Mono-Cultures of Different Yeast Strains. *Molecules*, 27(4), 1344.
- [Bi'15] Biswas, R., Uellendahl, H., & Ahring, B. K. (2015). Wet explosion: a universal and efficient pretreatment process for lignocellulosic biorefineries. *BioEnergy Research*, 8(3), 1101-1116.
- [Ch'16] Chen, W., Wu, F., & Zhang, J. (2016). Potential production of non-food biofuels in China. *Renewable Energy*, 85, 939-944.
- [Ch'20] Chougan, M., Ghaffar, S. H., Al-Kheetan, M. J., & Gecevicius, M. (2020). Wheat straw pre-treatments using eco-friendly strategies for enhancing the tensile properties of bio-based polylactic acid composites. *Industrial Crops and Products*, 155, 112836.
- [Da'20] da Silva, A. S. A., Espinheira, R. P., Teixeira, R. S. S., de Souza, M. F., Ferreira-Leitão, V., & Bon, E. P. (2020). Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: a critical review. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1-28.
- [Ga'20] Garlapati, V. K., Chandel, A. K., Kumar, S. J., Sharma, S., Sevda, S., Ingle, A. P., & Pant, D. (2020). Circular economy aspects of lignin:

- towards a lignocellulose biorefinery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 130, 109977.
- [Ga'14] Gawande, S. B., & Patil, I. D. (2014). Utilization of cereal grains for bioethanol production: a critical review. *Pratibha: International Journal of Science, Spirituality, Business and Technology*, 3(1), 60-66.
- [Ga'19] Galbe, M., & Wallberg, O. (2019). Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1-26.
- [Ga'20] Ganguly, P., Sengupta, S., Das, P., & Bhowal, A. (2020). Valorization of food waste: Extraction of cellulose, lignin and their application in energy use and water treatment. *Fuel*, 280, 118581.
- [Gh'16] Ghaffar S. H. (2016). Aggregated understanding of characteristics of wheat straw node and internode with their interfacial bonding mechanisms, Department of Mechanical, Aerospace and Civil Engineering College of Engineering, Design and Physical Sciences.
- [Gi'10] Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775-4800.
- [Gu'13] Guo, B., Zhang, Y., Yu, G., Lee, W. H., Jin, Y. S., & Morgenroth, E. (2013). Two-stage acidic-alkaline hydrothermal pretreatment of lignocellulose for the high recovery of cellulose and hemicellulose sugars. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(4), 1069-1087.
- [Ho'19] Horikawa, Y., Hirano, S., Mihashi, A., Kobayashi, Y., Zhai, S., & Sugiyama, J. (2019). Prediction of lignin contents from infrared spectroscopy: chemical digestion and lignin/biomass ratios of *Cryptomeria japonica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(4), 1066-1076.
- [Hu'20] Hu, L., Fang, X., Du, M., Luo, F., & Guo, S. (2020). Hemicellulose-based polymers processing and application. *American Journal of Plant Sciences*, 11(12), 2066-2079.
- [Hu'22] Huang, C., Jiang, X., Shen, X., Hu, J., Tang, W., Wu, X., ... & Yong, Q. (2022). Lignin-enzyme interaction: A roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111822.
- [Jö'16] Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103-112.
- [Ka'20] Karaffa, L.; Kubicek, C.P. Production of Organic Acids by Fungi; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020.
- [Ks'15] Kshirsagar, S. D., Waghmare, P. R., Loni, P. C., Patil, S. A., & Govindwar, S. P. (2015). Dilute acid pretreatment of rice straw,

- structural characterization and optimization of enzymatic hydrolysis conditions by response surface methodology. *RSC Advances*, 5(58), 46525- 46533.
- [Le'14] Lee, D. S., Wi, S. G., Lee, S. J., Lee, Y. G., Kim, Y. S., & Bae, H. J. (2014). Rapid saccharification for production of cellulosic biofuels. *Bioresource Technology*, 158, 239-247.
- [Ma'15] Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., & Guimarães, V. M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, 1, 44-49.
- [Mo'14] Moretti, M.M.D., Bocchini-Martins, D.A., Nunes, C.D.C., Villena, M.A., Perrone, O.M., da Silva, R., Boscolo, M., Gomes, E., 2014. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. *Appl. Energy*, 122, 189–195.
- [Mo'19] Momayez, F., Karimi, K., & Horváth, I. S. (2019). Sustainable and efficient sugar production from wheat straw by pretreatment with biogas digestate. *RSC Advances*, 9(47), 27692-27701.
- [Ni'16] Nikolić, S., Pejin, J., & Mojović, L. (2016). Challenges in bioethanol production: utilization of cotton fabrics as a feedstock. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 22(4), 375-390.
- [Ni'11] Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52-68.
- [Ra'14a] Rajan, K., & Carrier, D. J. (2014). Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 62, 222-227.
- [Ra'20] Raina, N., Slathia, P. S., & Sharma, P. (2020). Response surface methodology (RSM) for optimization of thermochemical pretreatment method and enzymatic hydrolysis of deodar sawdust (DS) for bioethanol production using separate hydrolysis and co-fermentation (SHCF). *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-21.
- [Ra'19] Ralph, J., Lapierre, C., & Boerjan, W. (2019). Lignin structure and its engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 240-249.
- [Re'17] Ren, S. (2017). Comparative analysis of some physicochemical properties of 19 kinds of native starches. *Starch-Stärke*, 69(9-10), 1600367.
- [RF'22] Renewable Fuels Association (2022). World Fuel Ethanol Production by Region. Annual World Fuel Ethanol Production (Mil. Gal.). <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>

- [Sa'17] Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E., & Sidiras, D. (2017). Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass and Bioenergy*, 100, 10-16.
- [Sa'18] Salapa, I., Topakas, E., & Sidiras, D. (2018). Simulation and optimization of barley straw organosolv pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 113, 80-88.
- [Si'20] Singh, B., & Kumar, A. (2020). Process development for sodium carbonate pretreatment and enzymatic saccharification of rice straw for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 138, 105574.
- [Sm'19] Smuga-Kogut, M., Piskier, T., Walendzik, B., & Szymanowska-Powałowska, D. (2019). Assessment of wasteland derived biomass for bioethanol production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 41, 1-8.
- [Ra'22] Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., Banu, J. R., Yoon, J. J., Bhatia, S. K., & Kim, S. H. (2022). Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and future perspectives. *Bioresource Technology*, 344, 126292.
- [Ur'20a] Ursachi, V. F., & Gutt, G. Main raw materials used for production of 1st and 2nd generation bioethanol. *Food and Environment Safety Journal*, 19(1), 48-68.
- [Ur'20b] Ursachi, V. F., & Gutt, G. (2020). Feedstocks used for production of 2nd and 3rd generation bioethanol-review. *Food & Environment Safety*, 19(2), 156-169.
- [Ur'20c] Ursachi, V. F., & Gutt, G. (2020). Physical and chemical pretreatments used for bioethanol production from lignocellulosic biomass-review. *Food & Environment Safety*, 19(3), 237-259.
- [Ur'20d] Production of cellulosic ethanol from enzymatically hydrolysed wheat straws. *Applied Sciences*, 10(21), 7638.
- [Xi'19] Xin, D., Chen, X., Wen, P., & Zhang, J. (2019). Insight into the role of α -arabinofuranosidase in biomass hydrolysis: cellulose digestibility and inhibition by xylooligomers. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1-11.
- [Zd'18] Zdanowicz, M., Wilpiszewska, K., & Szychaj, T. (2018). Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. *Carbohydrate Polymers*, 200, 361-380.
- [Zh'16] Zhang, J., Shao, S., & Bao, J. (2016). Long term storage of dilute acid pretreated corn stover feedstock and ethanol fermentability evaluation. *Bioresource Technology*, 201, 355-359.
- [Zh'18] Zheng, Q., Zhou, T., Wang, Y., Cao, X., Wu, S., Zhao, M., Guan, X. (2018). Pretreatment of wheat straw leads to structural changes and improved enzymatic hydrolysis. *Scientific Reports*, 8(1), 1-9.

DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRIILOR

Rezultatele cercetărilor experimentale efectuate în cadrul obiectivelor stabilite pentru teza de doctorat au fost publicate în 4 articole științifice, dintre care un articol într-o revistă de specialitate internațională și 3 articole în reviste în domeniul tezei din țară, recunoscute CNCSIS.

A. Articol publicat în revistă indexată ISI Web of Knowledge

Ursachi, V. F., & Gutt, G. (2020). Production of cellulosic ethanol from enzymatically hydrolysed wheat straws. *Applied Sciences*, 10(21), 7638, DOI: 10.3390/app10217638 (impact factor = 2.679)
<https://www.mdpi.com/2076-3417/10/21/7638>

B. Articole publicate în reviste indexate în Baze de Date Internaționale (BDI)

1. **Ursachi, V. F., & Gutt, G.** (2020). Physical and chemical pretreatments used for bioethanol production from lignocellulosic biomass – review. *Food and Environment Safety Journal*, 19(3), 237-259
<http://fens.usv.ro/index.php/FENS/article/view/734/664>
2. **Ursachi, V. F., & Gutt, G.** (2020). Feedstocks used for production of 2nd and 3rd generation bioethanol-review. *Food and Environment Safety Journal*, 19(2), 156-169
<http://fens.usv.ro/index.php/FENS/article/view/721/649>
3. **Ursachi, V. F., & Gutt, G.** (2020). Main raw materials used for production of 1st and 2nd generation bioethanol. *Food and Environment Safety Journal*, 19(1), 48-69
<http://fens.usv.ro/index.php/FENS/article/view/705/636>

C. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

1. **Ursachi, V. F., & Gutt, G.** Revealing the influence of dilute sulphuric acid pretreatment on enzymatic hydrolysis of residues wheat straw. *88 International scientific conference of young scientists and students, "Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution"*, Kyiv, Ucraina, aprilie-mai 2022.
2. **Ursachi, V. F., & Gutt, G.** Soft pretreatment and enzymatic hydrolysis of spruce sawdust to enhance production of bioethanol. *17th International Conference of Constructive Design and Technological Optimization in Machine Building, OPROTEH 2022*, Bacău, România, 25-27 mai 2022.
3. **Ursachi, V. F., & Gutt, G.** The first step of bioethanol production - extraction yield of cellulose from softwood sawdust. *CHIMIA 2020*, Constanța, Romania, 27-29 mai 2021.
4. **Ursachi, V. F., & Gutt, G.** Extraction methods of polyphenols from forestry waste. *85 International scientific conference of young scientists and students, "Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution"*, Kyiv, Ucraina, 11-12 aprilie 2020.
5. **Ursachi, V. F., & Gutt, G.** A comparative study on the extraction yield of cellulose from different types of wood sawdust – first step of bioalcohol production. *The 7th International Young Scientists Conference - Human - Nutrition - Environment*, Universitatea din Rzeszow, Polonia, 4-5 iunie 2018.