



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00800**

(22) Data de depozit: **12/10/2018**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2021** BOPI nr. **12/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2019 BOPI nr. **5/2019**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CĂLINESCU IOAN, STR. GHIRLANDEI
NR.38, BL.D 1, SC.C, PARTER, AP.21,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VÎNĂTORU MIRCEA, ALEEA MOINEȘTI
NR. 3, BL. 18, SC. 1, AP. 3, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **GAVRILA ADINA-IONUTA, STR. SIBIU
NR.10, BL.OS1, SC.E, ET.2, AP.172,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VARTOLOMEI ANAMARIA,
STR.LOGOFATUL TAUTU NR.60, BL.E,
AP.1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IGNAT NICOLEȚA DANIELA,
STR.AUREL BARANGA NR.124,
SAT VALEA VOIEVOZILOR, DB, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**CN 2205830; CN 101591614;
CN 202297580**

(54) **INSTALAȚIE CU ULTRASUNETE DESTINATĂ STUDIULUI
REAȚIILOR ENZIMATICE**



1 Invenția se referă la o instalație în care se poate studia efectul ultrasunetelor asupra
2 reacțiilor enzimatică, în scopul intensificării acestora. Instalația descrisă se poate utiliza la
3 scară de laborator (pentru cercetare) sau industrial (pentru producție).

4 Scopul invenției este descrierea unei instalații care să permită tratarea cu ultrasunete
5 de putere redusă, în mod perfect controlat (din punct de vedere al energiei ultrasonice
6 transmisă și al uniformității tratamentului) a unei enzime depuse pe suport care să fie utilizată
7 într-o serie de reacții chimice de sinteză a unor compuși organici (de exemplu: esteri).

8 Se cunoaște că efectul US asupra reacțiilor chimice nu este rezultatul interacției
9 directe a US cu speciile moleculare [**Suslick, "Sonochemistry" Science (1990) 247: 1439-
10 1445**]. Efectul US poate fi explicat prin două fenomene generate de trecerea ultrasunetelor
11 prin medii lichide, la nivel macroscopic se observă fenomenul de deplasare accelerată a
12 lichidului în zona sonotrodei (acoustic streaming), iar la nivel microscopic se observă
13 cavitațiile care prin colaps pot genera atât temperaturi cât și presiuni foarte mari, dar în
14 volume foarte mici (aproximativ $7 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^3$) și pentru timpi foarte scurți (0,1-0,5 ms) [**Chivate
15 and Pandit, "Quantification of cavitation intensity in fluid bulk" Ultrasonics
16 Sonochemistry (1995) 2: 519-525**].

17 Cavitația acustică implică trei stadii: nucleația, creșterea bulei și implozia acesteia.
18 De regulă tensiunea superficială a lichidului este suficient de mare pentru a împiedica
19 apariția bulei la trecerea sunetului prin apă. În prezența însă a gazelor dizolvate în lichid sau
20 a micro-particulelor solide antrenate în lichid, la o intensitate suficient de ridicată și o
21 frecvență potrivită a ultrasunetelor pot apare mici bule în lichid (nucleație).

22 Creșterea bulelor în mediul lichid implică două procese: difuzia și evaporarea pro-
23 dușilor volatili din faza lichidă în conținutul gazos al bulei (rectified diffusion) și coalescența
24 bulelor.

25 În prezența ultrasunetelor de intensitate mare o bulă de dimensiuni mici poate crește
26 rapid. Atunci când viteza de creștere este atât de mare încât nu mai are timp să se
27 recomprime la creșterea din nou a presiunii acustice apare implozia. Acest proces are loc
28 atunci când bula cavitațională are o dimensiune rezonantă cu câmpul de ultrasunete (la o
29 frecvență de 20 kHz, în apă, această dimensiune critică este de 170 μm). O astfel de bulă
30 este în fază cu câmpul de ultrasunete și va crește rapid în câteva cicluri acustice, după care
31 apare implozia. Implozia este ca o comprimare adiabată și poate genera local temperaturi
32 și presiuni atât de mari încât se pot forma specii active de tipul radicalilor.

33 Atunci când bula colapsează în vecinătatea unei particule solide care are o
34 dimensiune mai mare decât dimensiunea critică a bulei (150-200 μm), fenomenul de cavitație
35 este diferit (implozie asimetrică), cea mai mare parte a energiei eliberate în timpul imploziei
36 este transferată către un microjet de lichid care lovește particula solidă cu viteze ce pot
37 atinge sute de m/s [**Wolloch and Kost, "The importance of microjet vs shock wave
38 formation in sonophoresis", J. Control Release, (2010), 148: 204-211**]. Acest fenomen
39 stă la baza aplicației ultrasunetelor în curățarea suprafețelor.

40 La intensități mici de ultrasunete apare o creștere lentă a bulelor. Această creștere
41 este datorată fenomenului de "rectified diffusion" iar creșterea suprafeței bulei este mai mare
42 în timpul expansiunii decât micșorarea suprafeței acesteia în timpul comprimării. În acest fel
43 bula va crește dar nu are loc implozia, bula se va deplasa către suprafața lichidului [**Suslick,
44 "Sonochemistry", Science, (1990), 247: 1439-1445**]. Un astfel de fenomen este utilizat în
45 degazarea lichidelor cu ajutorul ultrasunetelor.

Fenomenul de cavitație este dependent de caracteristicile generatorului de US utilizat (forma, frecvența, puterea, amplitudinea, suprafața ce transmite US către lichid) dar și de caracteristicile lichidului în care apare cavitația (densitate, presiune de vapori, tensiune superficială, prezența și tipul gazelor dizolvate, prezența de impurități mecanice etc). Este semnalată chiar și influența presiunii exterioare aplicată fazei lichide [Sauter, Emin, Schuchmann and Tavman, "Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles", <i>Ultrasonics Sonochemistry</i> , (2008), 15:, 517-523].	1 3 5 7
Ultrasunetele au multe aplicații: curățarea suprafețelor (aplicații în reacțiile chimice catalitice), sudura materialelor plastice, activarea și intensificarea reacțiilor chimice, extracții de principii active din plante, diagnoza medicală, tratamente medicale și chiar analize chimice. Ele determină intensificarea proceselor fizice și chimice desfășurate în mediu omogen (îndeosebi prin generarea de specii active radicalice) sau heterogen (îndeosebi prin îmbunătățirea transferului de masă la interfața L/G sau mai ales L/S).	9 11 13
În ceea ce privește reacțiile enzimaticе, efectul US poate fi de inactivare a enzimelor [Chandrapala, Oliver, Kentish and Ashokkumar, "Ultrasonics in food processing - Food quality assurance and food safety", <i>Trends in Food Science & Technology</i> , (2012), 26: 88-98] (proces folosit îndeosebi în stabilizarea alimentelor) sau de activare a enzimelor.	15 17 19
Inactivarea enzimelor poate fi atribuită procesului de colaps cavitațional care conduce la apariția zonelor restrânse în care apar temperaturi și presiuni mari care determină formarea de specii active. Radicalii liberi OH care se formează atunci când faza lichidă conține apă, sunt cunoscuți pentru potențialul lor redox ridicat și pentru puterea mare de oxidare care face ca reacția lor cu aminoacizii, componenți ai enzimelor să aibă loc foarte rapid [Kadkhodaei and Povey, "Ultrasonic inactivation of <i>Bacillus α-amylase</i> . I. effect of gas content and emitting face of probe" <i>Ultrasonics Sonochemistry</i> , (2008), 15: 133-142].	21 23 25 27
Activarea reacțiilor enzimaticе este citată în literatură dar mecanismul prin care această activare are loc nu este pe deplin cunoscut. Este acceptată ipoteza că îmbunătățirea transferului de masă la interfața enzimă-amestec de reacție este datorată ultrasunetelor de intensitate scăzută și poate fi cauza intensificării reacțiilor enzimaticе [Delgado-Povedano and Luque de Castro, "A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship", <i>Analytica Chimica Acta</i> , (2015), 889: 1-21], [Khan and Rathod, "Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review" <i>Process Biochemistry</i> , (2015), 50: 1793-1806]. Mai este citată în literatură, o ipoteză referitoare la schimbarea structurii conformaționale a enzimei pentru a îmbunătăți accesul reactanților la centrul activ [Berezin, Klivanov, Klyosov, Martinek and Svedas, "The effect of ultrasound as a new method of studying conformational transitions in enzyme active sites", <i>FEBS Letters</i> , (1975), 49: 325-328]. Efectul de dezactivare a enzimelor este minimizat atunci când se folosesc enzime imobilizate pe suport [Delgado-Povedano and Luque de Castro, "A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship" <i>Analytica Chimica Acta</i> , (2015), 889: 1-21].	29 31 33 35 37 39 41
Concluzia datelor de literatură existente este aceea că reacțiile enzimaticе pot fi intensificate de ultrasunetele de putere mică, capabile să crească transferul de masă la interfața enzimă-amestec de reacție dar care nu generează cavitații importante ce ar produce radicali liberi, potențial dăunători pentru enzime.	43 45

Cele mai răspândite tipuri de reactoare ce pot fi utilizate pentru intensificarea reacțiilor chimice sau enzimatică citate în literatură [Gogate, Sutkar and Pandit, **"Sonochemical reactors: Important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems"**, Chemical Engineering Journal, (2011), 166; 1066-1082], [Delgado-Povedano and Luque de Castro, **"A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship"** Analytica Chimica Acta, (2015), 889: 1-21], [Khan and Rathod, **"Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review"**, Process Biochemistry, (2015), 50: 1793-1806] sunt cele care utilizează o sonotrodă direct introdusă în vasul de reacție (tip 1), cele care utilizează o baie de ultrasunete în care are loc reacția (tip 2) sau în care este plasat reactorul în care are loc reacția (tip 3), precum și dispozitive mai noi cum ar fi: celula de reacție cu două frecvențe de ultrasunete ('Dual Frequency reaction cell') (tip 4) sau reactor tubular de ultrasunete ('Clamp-on') (tip 5).

Fiecare dintre aceste tipuri de reactoare are limitări importante în ceea ce privește activarea reacțiilor enzimatică. În reactoarele de tipul 1, 4 și 5 principalul inconvenient este distribuția profund neuniformă a câmpului de ultrasunete [Chivate and Pandit, **"Quantification of cavitation intensity in fluid bulk"**, Ultrasonics Sonochemistry, (1995), 2: S19-S25] ceea ce va determina apariția fenomenului de cavitație în imediata vecinătate a sonotrodei (tip 1) sau a suprafeței vibrante (tip 4 și 5), iar cavitația intensă produce radicali liberi care apoi dezactivează rapid enzima. În baia de ultrasunete (reactoare tip 2 și 3) este dificil să reglezi puterea de ultrasunete, amplitudinea acestora sau să masori energia ultrasunetelor efectiv transmisă către reactorul în care are loc reacția enzimatică propriu-zisă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este intensificarea transferului de masă la suprafața enzimei imobilizate fără degradarea acesteia. Rezultatul direct fiind accelerarea reacției enzimatică.

Instalația, conform invenției, permite intensificarea transferului de masă la suprafața enzimei imobilizate fără degradarea acesteia, având ca rezultat accelerarea reacției enzimatică și este alcătuită dintr-un reactor cu secțiune circulară, fixat într-un vas mai mare, care conține un lichid de cuplaj/termostatare, prevăzut cu o manta pentru circulația lichidului de termostatare, vasul care conține lichidul de cuplaj având o parte inferioară conică spre interior, pentru a asigura uniformitatea iradierii cu ultrasunete, un dispozitiv de generare a semnalului de atac al unei sonotrode, cu posibilitatea de reglare a puterii ultrasonice și de modificare a ciclurilor de tip on/off cuplat cu sonotronda propriu-zisă pentru transmiterea ultrasunetelor în lichidul de cuplaj, a cărei poziție față de reactor poate fi modificată, fiind fixată la o distanță prestabilită față de reactor cu ajutorul unui dispozitiv de fixare mecanic, pentru a asigura flexibilitatea funcțională a instalației, o pompă dozatoare pentru recircularea amestecului de reacție, un vas cu site moleculare pentru reținerea apei și deplasarea echilibrului reacției, un răcitor și un vas colector.

Se prezintă în continuare date și exemple de realizare a invenției în legătură cu fig. 1 și 2.

Fig. 1, reprezintă schița reactorului termostatat în stare statică. Reactorul propriu-zis (4) este un tub de sticlă cu diametrul de 1-2 cm ce conține enzima imobilizată și care este sudat într-un corp cilindric din sticlă, prevăzut cu un fund sferic, orientat înspre reactor și sursa de ultrasunete (pentru dispersia cât mai uniformă a ultrasunetelor) și cu o manta de termostatare (3) prin care circulă un lichid de răcire. Acest corp cilindric conține lichidul de cuplaj (2) care permite transferul energiei ultrasunetelor de la sonotrodă (1) către reactorul

(4). Lichidul de cuplaj poate fi apă sau un alt lichid capabil să transfere energia de ultrasunete. Proprietățile fizice ale acestuia (tensiunea superficială, presiunea de vapori, vâscozitatea) precum și temperatura la care este termostatat determină transferul ultrasunetelor de la sonotrodă la reactor. Mantaua de termostatare este necesară pentru menținerea temperaturii lichidului de cuplaj și a reactorului, deoarece în timpul tratamentului cu ultrasunete lichidul de cuplaj se poate încălzi.

Fig. 2, reprezintă schița de ansamblu a instalației cu ultrasunete destinată studiului reacțiilor enzimatiche, în funcțiune. Aceasta cuprinde următoarele componente: reactorul termostatat (4) prin care circulă în mod continuu amestecul de reacție cu ajutorul unei pompe dozatoare (8). La ieșirea din reactor amestecul de reacție trece prin vasul cilindric (5) cu site moleculare granulate pentru reținerea apei rezultate din reacția de esterificare enzimatică și de deplasare a echilibrului reacției, în continuare amestecul de reacție trece printr-un schimbător de căldură (6), cu rolul de a răci amestecul de reacție pentru a evita pierderile prin evaporare atunci când se obțin esteri cu volatilitate ridicată și ajunge în vasul colector (7). Acest vas permite funcționarea "în buclă" a instalației pentru tratarea unor volume mari de reacție cu ajutorul reactorului (4) care are un volum mic de tratare. În zona vasului colector există și un dispozitiv pentru prelevarea probelor (9), pentru a determina evoluția conversiei reacției de esterificare.

Instalația conține o inovație structurală și funcțională față de reactoarele clasice cu ultrasunete. Caracterul inovativ al instalației (descrisă în fig. 1), constă în:

- complexitatea structurală și funcțională care permite utilizarea acesteia pentru studierea unor reacții catalizate de enzime depuse pe suport prin următoarele:

- reactorul funcționează în mod continuu prin trecerea amestecului de reacție prin stratul de enzimă depusă pe suport;

- dacă timpul de reacție necesar conversiei dorite este mai lung decât timpul de staționare al amestecului de reacție în reactor, atunci se poate utiliza un sistem în buclă (vezi fig. 2);

- prin formă caracteristică a părții de jos a vasului care conține lichidul de cuplare/termostatare se asigură reflectarea undelor ultrasonore având ca efect uniformizarea tratării cu US a reactorului, pe toată lungimea lui;

- prin existența unei mantale de răcire-termostatare se poate menține constantă temperatura atât în vasul de reacție cât și în vasul care conține lichidul de cuplare, ceea ce permite tratarea cu ultrasunete pe perioade lungi de timp cu aceeași intensitate și uniformitate.

- flexibilitatea structurală și funcțională prin:

- drept sursă de ultrasunete se folosește un dispozitiv de tip sonotrodă alimentat de la un generator de ultrasunete ce permite controlul foarte fin al tratării cu ultrasunete prin modificarea amplitudinii, astfel se poate regla puterea efectiv transmisă către lichidul de cuplare și implicit în vasul de reacție;

- prin ajustarea poziției sonotrodei față de reactor se poate regla puterea ultrasonică efectiv introdusă în vasul de reacție;

- iradierea cu ultrasunete se realizează prin intermediul unui lichid de cuplaj. Caracteristicile lichidului (tensiunea superficială, presiunea de vapori, vâscozitatea) precum și temperatura la care este termostatat determină transferul ultrasunetelor de la sonotrodă la reactor;

- prin modificarea tipului de lichid de cuplare utilizat se poate regla efectul ultrasunetelor în reactor.

Pentru utilizarea acestei instalații în vederea studierii reacțiilor enzimatice trebuie parcurs următoarele etape:

Etapa 1: Determinarea condițiilor optime de tratare cu ultrasunete. În acest scop se va urmări maximizarea intensificării transferului de masă în reactor concomitent cu minimizarea formării de specii radicalice active care ar putea denatura enzima. Aceste condiții optime sunt date de puterea de ultrasunete utilizată, de distanța dintre sonotrodă și reactor dar sunt dependente și de natura și temperatura lichidului de cuplaj.

Pentru urmărirea intensificării transferului de masă cu ajutorul ultrasunetelor se adaugă în reactor o sare colorată (pentru a se putea determina colorimetric concentrația de sare dizolvată) sub formă de cristale cu dimensiuni apropiate de cele ale suportului enzimei și se fac experimentări cu modificarea distanței dintre sonotrodă și reactor.

Pentru a se determina formarea de specii radicalice active, se urmărește transformarea unui compus (*p*-nitrofenol) sub influența ultrasunetelor. Acest compus se dizolvă într-un solvent care circulă prin reactor, dar este utilizat și drept lichid de cuplaj. Condițiile de tratare cu ultrasunete se aleg în așa fel încât degradarea compusului să fie cât mai mică.

Etapa 2: Studiul reacțiilor enzimatice. Doar după ce au fost determinate condițiile de utilizare ale ultrasunetelor pentru maximizarea transferului de masă concomitent cu minimizarea formării de specii active ce pot degrada enzima, se poate face studiul reacțiilor enzimatice activate de ultrasunete. În acest scop se va încălca reactorul cu o cantitate de enzimă pe suport și vasul tampon cu amestecul de reactanți. După pornirea pompei dozatoare se iau probe la intervale de timp prestabilite pentru urmărirea reacției.

Pentru demonstrarea calităților acestei instalații s-au efectuat experimentări prin care s-au evidențiat intensificarea transferului de masă, degradarea unor compuși organici datorită speciilor active generate de ultrasunete precum și efectul ultrasunetelor asupra unor reacții de esterificare catalizate de enzime.

Exemplul 1

Pentru studierea intensificării transferului de masă în reactor, s-a ales un model format din o sare colorată și un solvent în care sarea are o solubilitate limitată la temperatura de testare. Domeniul de temperatură a fost astfel ales încât să corespundă și cu temperatura la care se studiază și reacția de esterificare.

Drept sare s-a ales sulfatul de nichel hidratat (culoare verde), iar drept solvent un amestec apă-etanol 50%. În reactor s-a adăugat o cantitate de sare și de solvent astfel determinată încât, în condiții optime să se dizolve cam 25-30% din sare în solvent. Concentrația de sare dizolvată a fost determinată colorimetric, după terminarea tratamentului cu ultrasunete. Toate determinările au fost efectuate în triplicat și s-a efectuat și un experiment în care sarea s-a dizolvat natural, fără influența ultrasunetelor.

Influența temperaturii și a distanței dintre sonotrodă și reactor este prezentată în tabelul 1. După cum se observă din analiza acestor date, odată cu creșterea temperaturii procesul de dizolvare naturală a sării are loc cu o viteză ușor mai mare. În experimentările în care s-au utilizat și ultrasunete viteza de dizolvare a sării este sensibil mai mare decât în procesul convențional, demonstrând influența ultrasunetelor asupra transferului de masă. Cantitatea de sare dizolvată este dependentă de distanța dintre sonotrodă și reactor și de temperatură.

Rezultatele din tabelul 1 indică faptul că există o temperatură optimă la care sarea se dizolvă în cantitatea cea mai mare. Acest fapt este în concordanță cu datele de literatură care indică faptul că efectul ultrasunetelor în apă (apa este folosită drept lichid de cuplaj) scade când temperatura depășește o anumită valoare [Mason, Lorimer and Bates, "Quantifying sonochemistry: Casting some light on a 'black art'" Ultrasonics, (1992), 30: 40-42].

RO 133341 B1

Concentrația sulfatului de Ni dizolvat la diverse temperaturi: dizolvare naturală (convențională) și cu ultrasunete (sonda de sonicare la 3,5 cm respectiv 4,5 cm distanță de reactor), 20% amplitudine, putere de US de 7 W, 3 on/3 off, timp de 30 min

Tabelul 1

Temperatura, (°C)	Concentrația sulfatului de Ni dizolvat (g/L)		
	Dizolvare naturală	Dizolvare cu tratament de ultrasunete, la diferite distanțe ale sonotrodei față de reactor	
		3,5 cm	4,5 cm
30	91,4 ± 0,4	102,0 ± 1,3	111,2 ± 11,6
40	101,9 ± 0,4	114,7 ± 0,8	125,2 ± 11,2
50	103,0 ± 0,2	134,5 ± 1,4	164,9 ± 1,5
55	103,2 ± 1,4	142,6 ± 0,5	153,3 ± 0,9
60	103,9 ± 0,7	125,5 ± 0,8	126,8 ± 0,4

Pentru stabilirea mai exactă a influenței distanței dintre sonotrodă și reactor asupra intensificării transferului de masă, au mai fost efectuate un set de experimentări în care a fost utilizată aceeași temperatură, același timp și aceeași putere de ultrasunete, modificându-se doar distanța dintre sonotrodă și reactor. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Concentrația sulfatului de Ni dizolvat, după aplicarea ultrasunetelor, cu sonda de sonicare la diferite distanțe de reactor, la 50 °C, 20% Ampl., 3 on/3 off, timp de 30 de min

Tabelul 2

Distanța sonotrodă - reactor (cm)	Concentrația sulfatului de Ni dizolvat (g/ L)
2,2	103,9 ± 0,8
2,5	109,4 ± 1,4
3	123,9 ± 0,5
3,5	133,8 ± 1,4
4	151,4 ± 0,2
4,5	165,1 ± 0,5
5	175,5 ± 0,2
6	166,3 ± 0,8

Intensificarea transferului de masă la interfața cristale solide - solvent poate fi explicată prin forțele de forfecare ('shear waves') ce apar la interfața lichid-solid atunci când undele sonore longitudinale ajung la această interfață [Dukhin and Goetz, **"Fundamentate of Acoustics in Homogeneous Liquids"** Characterization of Liquids, Dispersions, Emulsions, and Porous Materials Using Ultrasound (Third Edition), (2017): 85-118]. Acest fenomen duce la reînnoirea suprafeței de contact dintre faza lichidă și solid, prin transportul convectiv al unor elemente de fluid din masa acestuia la interfață.

Undele sonore longitudinale au o atenuare foarte scăzută în apă (folosită drept lichid de cuplaj), la 20 kHz, factorul de atenuare este de doar 0,04 dB/cm/MHz [Dukhin and Goetz, "*Fundamentals of Acoustics in Homogeneous Liquids*", Characterization of Liquids, Dispersions, Emulsions, and Porous Materials Using Ultrasound (Third Edition), (2017): 85-118]. Datorită acestui fapt adâncimea de pătrundere este de aproximativ 1000 m ceea ce face ca pentru distanțele foarte scurte dintre sonotrodă și reactor atenuarea undelor sonore longitudinale să fie practic nulă. Creșterea eficienței de dizolvare a sării în solvent (respectiv un transfer de masă mai bun), odată cu creșterea distanței dintre sonotrodă și reactor este datorată geometriei instalației ce conferă o uniformitate mai bună a iradierii ultrasonice.

Exemplul 2

Pentru cuantificarea speciilor active generate de ultrasunete s-a ales drept model degradarea *p*-nitro fenolului la *p*-nitro catehol. Atât în reactor cât și drept lichid de cuplaj s-a utilizat aceeași soluție diluată de *p*-nitrofenol ($5,6 \cdot 10^{-6}$ g/mL în apă). Degradarea *p*-nitrofenolului s-a urmărit prin spectrometrie în UV-VIS, la 401 nm.

În tabelul 3 sunt prezentate rezultatele obținute la tratarea cu US, 20% Ampl, 3 on/3 off și o energie de 107 J (timp 15 sec). Se poate observa că efectul ultrasunetelor este mai mic în reactor decât în lichidul de cuplaj și că acest efect scade odată cu creșterea distanței dintre sonotrodă și reactor. Acest fapt este coerent cu datele de literatură care indică o scădere abruptă a intensității efectelor de cavitație odată cu creșterea distanței față de sonotrodă [Chivate and Pandit, "*Quantification of cavitation intensity in fluid bulk*", *Ultrasonics Sonochemistry*, (1995), 2: S19-S25].

Eficiența degradării p-nitrofenolului în funcție de distanța dintre sonotrodă și reactor în reactor și în lichidul de cuplaj, la 50 °C, cu o energie de ultrasunete de 107 J (20% Ampl, 3 on/3off)

Tabelul 3

Distanța sonotrodă - reactor (cm)	Eficiența degradării <i>p</i> -nitrofenolului (%)	
	În reactor	În lichidul de cuplaj
2,2	27,8 ± 0,12	29,5 ± 0,13
2,5	23,7 ± 0,04	28,5 ± 0,06
3	19,6 ± 0,07	24,7 ± 0,05
3,5	13,0 ± 0,04	19,2 ± 0,07
4,5	1,6 ± 0,01	10,8 ± 0,03

În alt set de experiențe, s-a utilizat în loc de apă, o soluție de 50% etanol în apă, păstrându-se aceeași concentrație de *p*-nitrofenol. Deoarece soluția de etanol are o presiune de vapori mai mare decât apa și o tensiune superficială mai mică, fenomenul de cavitație apare mai ușor în lichidul de cuplaj, dar datorită faptului că etanolul intră mai ușor în bula cavitațională energia ultrasunetelor se consumă (efect de amortizare - 'cushioning effect') mai rapid, iar efectul acestora în reactor este mai slab (tabelul 4).

Eficiența degradării p-nitrofenolului funcție de energia de US transmisă și de tipul de solvent: apă sau o soluție 50% alcool etilic-apă (20% Amplitudine, putere de US = 7 W, 3 on/3 off, la 50 °C)

Tabelul 4

Energie US (J)	Eficiența degradării p-nitrofenolului (%)			
	Apă		Soluție 50% etanol în apă	
	Reactor	Lichid de cuplaj	Reactor	Lichid de cuplaj
107	15,7 ± 0,05	17,7 ± 0,06	2,3 ± 0,04	18,5 ± 0,12
161	19,4 ± 0,01	21,1 ± 0,04	6,5 ± 0,02	22,6 ± 0,06

Exemplul 3

Pentru a pune în evidență efectul ultrasunetelor asupra unei reacții de esterificare enzimatică s-au efectuat un set de experimentări în care s-a studiat reacția de esterificare dintre acidul acetic și alcoolul *i*-amilic (raport molar 1:2) în prezența unei enzime de tip lipază (*Mucor miehei*) imobilizată pe un suport macroporos de rășină schimbătoare de ioni anionică (Lipozyme 435 de la Novozymes). Pentru a deplasa echilibrul către obținerea esterului s-a utilizat un sistem de reactor în 'bucă' în care amestecul de reacție circulă în continuu prin reactor, un vas cu site moleculare pentru reținerea apei, un răcitor și vasul tampon [Azocar, Navia, Beroiz, Jeison and Ciudad, "Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor", N. Biotechnol, (2014), 31: 422-429]. S-a utilizat o cantitate de enzimă de 0,047 g pe gramul de amestec de reacție. Iradierea cu US s-a efectuat la o amplitudine de 20% (7 W) în ciclul de operare 3 on/3 off cu utilizarea apei drept lichid de cuplaj. Probele au fost prelevate după 1 și 2 h și analizate cromatografic pentru determinarea concentrației de ester. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5. Se poate observa că pe domeniul de temperatură studiat, efectul ultrasunetelor a fost deosebit de important. După o oră concentrația de ester a fost cu 76% mai mare decât cea obținută convențional la 30°C; cu 103% mai mare la 40°C și cu 70% mai mare la 50°C. După 2 h concentrația de ester obținută la tratamentul cu US continuă să fie mai mare decât cea obținută la convențional, dar diferențele sunt ceva mai mici deoarece concentrația obținută se apropie de concentrația la conversie totală, respectiv cu 51% mai mare la 30°C, cu 28% mai mare la 40°C și cu 6% mai mare la 50°C.

Evoluția concentrației de ester în timp, la diferite temperaturi, iradiere cu US vs convențional. Raport molar alcool amilic: acid acetic 1:2, viteza de curgere amestec reacție prin reactor 0,16 ml/min, încărcare enzimă 0,047 g enzimă/g amestec reacție, ultrasunete: amplitudine 20% puls: 3 on/3 off, distanță sonotrodă-reactor 4,5 cm. Concentrație maximă ester 560 mg/g

Tabelul 5

Condiții reacție: temp./tip tratament→	Concentrație ester (mg/g)					
	30°C		40°C		50°C	
	US	conv.	US	conv.	US	conv.
Timp reacție (h)↓						
1	132,9 ± 0,4	75,3 ± 0,7	203,5 ± 0,5	100,2 ± 0,5	374,8 ± 0,6	220,4 ± 1,0
2	278,7 ± 0,8	184,7 ± 0,4	383,5 ± 0,9	299,7 ± 0,8	472,9 ± 0,4	447,1 ± 0,9

3 Instalație cu ultrasunete destinată studiului reacțiilor enzimatice, **caracterizată prin**
5 **aceea că**, permite intensificarea transferului de masă la suprafața enzimei imobilizate fără
7 degradarea acesteia, având ca rezultat accelerarea reacției enzimatice și este alcătuită
9 dintr-un reactor cu secțiune circulară, fixat într-un vas mai mare, care conține un lichid de
11 cuplaj/termostatare, prevăzut cu o manta pentru circulația lichidului de termostatare, vasul
13 care conține lichidul de cuplaj având o parte inferioară conică spre interior, pentru a asigura
15 uniformitatea iradierii cu ultrasunete, un dispozitiv de generare a semnalului de atac al unei
sonotrode, cu posibilitatea de reglare a puterii ultrasonice și de modificare a ciclurilor de tip
on/off cuplat cu sonotronda propriu-zisă pentru transmiterea ultrasunetelor în lichidul de
cuplaj, a cărei poziție față de reactor poate fi modificată, fiind fixată la o distanță prestabilită
față de reactor cu ajutorul unui dispozitiv de fixare mecanic, pentru a asigura flexibilitatea
funcțională a instalației, o pompă dozatoare pentru recircularea amestecului de reacție, un
vas cu site moleculare pentru reținerea apei și deplasarea echilibrului reacției, un răcitor și
un vas colector.

(51) Int.Cl.

C12M 1/42 (2006.01);

C12Q 1/00 (2006.01)

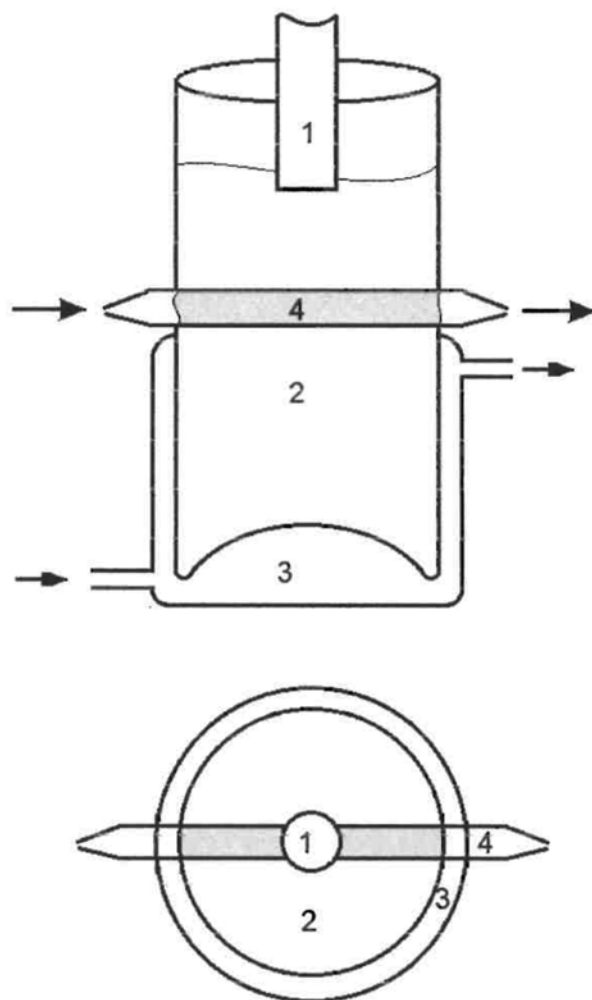


Fig. 1

(51) Int.Cl.

C12M 1/42 (2006.01),

C12Q 1/00 (2006.01)

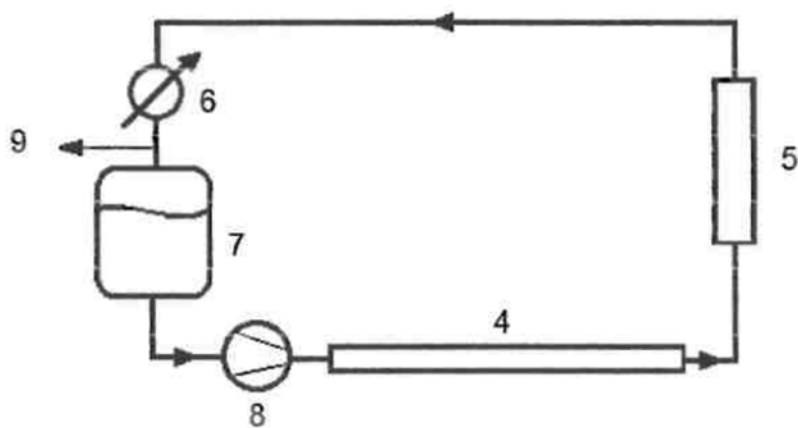


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 559/2021