



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00714**

(22) Data de depozit: **07/11/2019**

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

(41) Data publicării cererii:
29/05/2020 BOPI nr. **5/2020**

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

(72) Inventatori:
• **GAVRILĂ ADINA IONUȚA, STR. SIBIU,
NR.10, BL.OS1, SC.E, ET.2, AP.172,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **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;**
• **VARTOLOMEI ANAMARIA,
BVD. AUREL VLAICU, NR.11, CONSTANȚA,
CT, RO;**
• **IGNAT NICOLETA DANIELA,
STR.AUREL BARANGA NR.124,
SAT VALEA VOIEVOZILOR, DB, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**KAROLINA KUCHARSKA,
"PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC
MATERIALS AS SUBSTRATES FOR
FERMENTATION PROCESSES",
MOLECULES, VOL. 23, P. 2937, 2018;
US 2016/0017540 A1**

(54) **METODĂ DE PRETRATAMENT ALCALIN AL BIOMASEI
LIGNOCELULOZICE ÎN PREZENȚA ESTERILOR METILICI
AI ACIZILOR GRAȘI (FAME)**



RO 134127 B1

1 Invenția se referă la o metodă simplificată de pretratament alcalin al biomasei
lignocelulozice în prezența esterilor metilici ai acizilor grași (FAME). Prin această metodă se
3 realizează delignifierea materialului lignocelulozic simultan cu îndepărtarea cerurilor și a
substanțelor extractibile care pot acționa ca inhibitori ai proceselor ulterioare de hidroliză a
5 celulozei. Biomasa lignocelulozică astfel pretrată manifestă o disponibilitate ridicată la
hidroliza enzimatică.

7 Pretratamentul biomasei lignocelulozice joacă un rol esențial în obținerea de
materiale cu digestibilitate enzimatică acceptabilă și fermentabilitate ulterioară pentru produ-
9 cerea de etanol celulozic sau de alți biocombustibili cum ar fi butanolul derivat din biomasă.
Pretratamentul este o etapă necesară pentru modificarea structurii lignocelulozei și
11 îmbunătățirea accesului enzimelor în timpul hidrolizei enzimatice (**Alvira P., Tomas-Pejo E.,
Ballesteros M., Negro M.J., „Pretreatment technologies for an efficient bioethanol
13 production process based on enzymatic hydrolysis: a review”. *Bioresource
Technology*, (2010), 10: 4851-4861**). În prezent, procedurile de pregătire și de pretratament
15 al biomasei lignocelulozice în vederea fracționării acesteia în componente valoroase a fost
intensiv investigată. Metodele de pretratament pot fi de natură fizică (măcinare, iradiere cu
17 ultrasunete sau microunde), chimică (tratate cu acizi sau baze, ozonoliză, lichide ionice) sau
biologică (prin tratate cu fungi sau bacterii). Deși aceste metode au evoluat, pretratarea este
19 încă unul dintre cei mai scumpi pași din întregul proces de conversie a biomasei lignocelu-
lozice în produse valoroase. Analiza telineco-economică a proceselor de producție a etano-
21 lului lignocelulozic arată că etapele pretratării reprezintă între 11-27% din costurile totale, în
funcție de metoda de pretratament a biomasei utilizată (**Kucharska K., Rybarczyk P.,
23 Holowacz I., Lukajtis R., Glinka M., Kaminski M., „Pretreatment of Lignocellulosic
Materials as Substrates for Fermentation Processes”, *Molecules*, (2018), 23: 2937**).
25 Pentru reducerea acestor costuri este indicată înlocuirea solvenților scumpi, de exemplu
lichide ionice (**US 2016/0017540 A1**, Pretreatment and fractionation of lignocellulosic
27 biomass) cu solvenți mult mai ieftini (FAME) și de asemenea micșorarea numărului de etape
ale procesului. O metodă eficientă de pretratament o reprezintă acțiunea soluțiilor alcaline.
29 Tratamentul alcalin poate fi utilizat pentru îndepărtarea ligninei crescând astfel digestibilitatea
celulozei. Comparativ cu pretratamentul acid și procesele hidrotermale, pretratamentul
31 alcalin conduce la o mai mică solubilizare a hemicelulozelor, formarea în cantitate mai mică
a compușilor inhibitori și are avantajul că are loc la temperaturi mai scăzute. Reactivii alcalini
33 degradează catenele laterale de tip ester și legăturile glicozidice care conduc la modificarea
structurală a ligninei, umflarea celulozei, decristalizarea celulozei și solubilizarea hemicelulo-
35 zei. Pentru hidroliza enzimatică este esențial să eliminăm lignina pentru a avea acces eficient
la celuloza reducătoare (**Kumar A.K., Sharma S., „Recent updates on different methods
37 of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review”, *Bioresourcess and
Bioprocessing*, (2017), 4(7): 1-19**).

39 Biomasa lignocelulozică este în principal formată din celuloză (38-50%), hemiceluloză
(23-32%), lignină (15-25%), precum și cantități mici de extractibile. Extractibilele sau
41 componentele străine sunt acele substanțe care sunt îndepărtate din pereții celulelor
lignocelulozice prin extracție cu solvenți neutri. Aceste materiale sunt substanțe extra-
43 parietale care sunt depuse după formarea peretelui celular și care nu sunt considerate
componente esențiale ale peretelui celular (**Soltes EJ, „Wood and Agricultural Residues,
45 Research on Use for Feed, Fuels, and Chemicals”, Academic Press, 1983**). Cele mai
mari cantități se găsesc în lumenul celular, dar pot fi de asemenea prezente în matricea
47 peretelui celular. Cantitățile de extractibile din țesuturi variază în funcție de speciile de plante,

de familie și de țesuturi, iar componentele sunt extraordinar de diverse (Hillis W.E. „*Occurrence of Extractives in Wood Tissues in Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*”, Academic Press, 1985). Datorită acestei diversități, nu au existat proceduri generalizate de izolare și de determinare a compușilor individuali. Mai mulți cercetători au prezentat o discuție aprofundată privind clasificarea chimică, biosinteza, izolarea și cuantificarea extractibilelor (Sjostrom E. „*Wood Chemistry Fundamentals and Applications*”, 2nd ed. Academic Press, 1993, Lewin M and Goldstein I „*Wood Structure and Composition*” Marcel Dekker, Inc., 1991).

Substanțele extractibile din lemn sunt un grup eterogen de compuși care poate fi extras cu solvenți polari sau nepolari. Ele constau în principal din terpene, grăsimi, proteinele, cerurile, rășinile și compuși fenolici și deși sunt prezenți în cantități mici, sunt esențiale pentru prelucrarea ulterioară a biomasei (Thammasouk K., Tandjo D., Penner M.H., „*Influence of Extractives on the Analysis of Herbaceous Biomass*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1997), 45(2):437-443). Majoritatea inhibitorilor derivați de lignoceluloză se formează în timpul pretratamentului când substanțele extractibile, hemicelulozele și/sau lignina sunt solubilizate și degradate. În timpul pretratamentului alcalin substanțele extractibile se pot transforma în compuși fenolici sau extracte grase care pot precipita și acționează ca inhibitori în procesele ulterioare de zaharificare enzimatică (Jonsson U., Martin C., „*Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects*”, *Bioresource Technology*, (2016), 199:103-112). Pentru a evita formarea compușilor inhibitori, înainte de pretratamentul alcalin al biomasei lignocelulozice se îndepărtează materialele extractibile prin tratare la reflux, timp de 4-6 h, cu diferiți solvenți (acetona, diclorometan, toluen, etanol) și tratare ulterioară cu apă fierbinte. Aceste metode scad eficiența economică a proceselor industriale, atât datorită consumului de solvenți cât și a consumului energetic din timpul tratamentului. În plus, procesele necesită echipamente suplimentare pentru realizarea acestor etape (Suna R.C., Tomkinson J., „*Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw*”, *Carbohydrate Polymers*, (2002) 50:263-271; Liu C.F., Ren J.L., Xu F., Liu J.J., Sun J.X., Sun R.C., „*Isolation and Characterization of Cellulose Obtained from Ultrasonic Irradiated Sugarcane Bagasse*”, *J. Agric. Food Chem.* (2006) 54: 5742-5748).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în stabilirea unui procedeu simplificat de pretratament a biomasei lignocelulozice astfel încât să determine obținerea unei concentrații ridicate de zaharuri în procesul de hidroliză enzimatică.

Metoda de pretratament alcalin a biomasei lignocelulozice în prezența esterilor metilici ai acizilor grași, în vederea îndepărtării simultane a substanțelor extractibile și a ligninei, conform invenției, realizează tratarea a 2 g rumeguș, cu o dimensiune de 0,315...0,5 mm, timp de 20 min, cu 200 mL soluție NaOH cu o concentrație de 0,1...1 N, în care se introduc 0,1...0,5% față de volumul total de reacție, esteri metilici ai acizilor grași, la o temperatură de 25°C, cu agitare la 600 rpm, urmată de separarea rezidului și spălarea cu apă distilată până la pH neutru și cu o soluție apoasă de 0,1% surfactant în sine cunoscut, filtrarea rezidului pretrat și hidroliza enzimatică a acestuia în amestec cu o soluție tampon de acid citric - fosfat disodic la un raport rumeguș pretrat:soluție tampon de 1:25 greutate/volum solid/lichid, utilizând ca biocatalizator - enzimă de tip celulaze într-un raport de 0,7 mL/g_{rumeguș}, timp de 72 h la temperatura de 50°C și viteza de agitare 120 rpm, obținându-se o delignifiere a rumegușului cu până la 24,5% și o creștere a concentrației zaharurilor reducătoare cu până la 21,8% față de cele obținute la hidroliza enzimatică a rumegușului pretrat în absența esterilor metilici ai acizilor grași.

RO 134127 B1

1 Invenția prezintă următoarele avantaje:

3 - reducerea numărului de etape ale procesului de delignifiere a biomasei lignocelulo-
zice prin îndepărtarea cerurilor și a substanțelor extractibile simultan cu delignifierea
biomasei;

5 - ceșterea cu aproximativ 22% a conținutului de zaharuri reducătoare în biomasa
pretratată alcalin în prezența FAME supusă hidrolizei enzimatică comparativ cu metodele
7 convenționale.

9 Scopul acestei invenții este acela de a simplifica procedeul de pretratament al
biomasei lignocelulozice prin utilizarea unui solvent ieftin - esteri metilici ai acizilor grași
(FAME) adăugat în cantități mici în timpul pretratamentului alcalin și care este capabil să
11 simplifice procesul (se îndepărtează substanțele extractibile în aceeași etapă cu delignifierea
biomasei) și în același timp să-l facă mai eficient (permite obținerea unor concentrații
13 crescute de zaharuri în etapa de hidroliză enzimatică a materialului astfel pretratată).

15 FAME are două roluri în pretratamentul alcalin, pe de o parte, are rol de solvent
pentru materialele extractibile și compușii rezultați în urma delignifierii materialului ligno-
celulozic, iar pe de altă parte poate reacționa parțial cu hidroxidul de sodiu și formează
17 săpunuri (săruri de sodiu ale acizilor grași) care datorită proprietăților superficial active pot
emulsiona cerurile și substanțele extractibile.

19 *Descrierea metodei de pretratament alcalin al biomasei lignocelulozice în prezența
esterilor metilici ai acizilor grași (FAME)*

21 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este eficientizarea pretratamentului
materialelor lignocelulozice printr-o metodă simplificată de pretratament alcalin al biomasei
23 lignocelulozice în prezența esterilor metilici ai acizilor grași (FAME). Prin această metodă se
realizează delignifierea materialului lignocelulozic simultan cu îndepărtarea cerurilor și a
25 substanțelor extractibile care pot acționa ca inhibitori ai proceselor ulterioare de hidroliză a
celulozei.

27 Pretratamentul alcalin s-a realizat la temperatura camerei, în prezența unei cantități
mici (0,1-0,5% față de volumul total de reacție) de esteri metilici ai acizilor grași (**FAME cu
29 specificatiile conform EN 14214 - European Committee for Standardization, Liquid
petroleum products - Fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and
31 heating applications - Requirements and test methods BS EN 14214:2012 +A2:2019**),
folosind soluții de hidroxid de sodiu de diferite concentrații (0,1-1 N). Rolul esterilor este de
33 solvent pentru materialele extractibile și de a reacționa în timpul procesului cu hidroxidul de
sodiu cu formarea săpunului care să emulsioneze și să antreneze extractibilele din
35 rumegușul brut. După pretratamentul alcalin, amestecul este supus filtrării, iar faza lichidă
este supusă analizei spectrofotometrice pentru determinarea conținutului de lignină (**Sluiter
37 A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D., "Determination
of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass", Laboratory Analytical Procedure
39 (LAP), NREL, (2005)**). Rumegușul separat prin filtrare este spălat cu o soluție slabă de
surfactant (0,1%) pentru îndepărtarea completă a esterilor netransformați în săpun, care pot
41 acționa ca inhibitori în procesul de hidroliză enzimatică, urmată de spălare cu apă distilată
până la pH-neutru. Rumegușul pretratată este supus hidrolizei enzimatică timp de 72 h în
43 vederea obținerii zaharurilor. Hidroliza enzimatică s-a realizat în soluție tampon de acid citric
- fosfat disodic (pH = 5), utilizând ca biocatalizatori - celuloazele, sortimentul comercial
45 Celluclast 1,5 L.

47 După hidroliza enzimatică, amestecul de reacție este încălzit la 100°C pentru
dezactivarea enzimei, răcit și centrifugat pentru separarea rezidului solid. Faza lichidă a fost
supusă analizei spectrofotometrice de determinare a zaharurilor reducătoare utilizând
49 metoda spectrofotometrică prin tratare cu reactivul DNS (acidul 3,5-dinitrosalicilic) și măsura

rea absorbantei la lungimea de undă de 575 nm (Miller G. L., "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", Anal. Chem. (1959), 31(3), 426-428 și TAPPI (1979) Official Test Methods and Provisional Test Methods. Technical Association of the Pulp and Paper Industries). 1
3

În continuare sunt prezentate 3 exemple de pretratament alcalin în prezența esterilor metilici ai acizilor grași care ilustrează invenția fără a o limita. Exemplele sunt date și în legătură cu schema fluxului de operații a invenției "Metodă de pretratament a biomasei lignocelulozice cu ajutorul esterilor metilici ai acizilor grași (FAME)" care este prezentată în fig. 1. În exemplele următoare se prezintă eficiența metodei de pretratament în funcție de modificarea parametrilor principali de reacție, precum și eficiența acestei metode în procesele de hidroliză enzimatică a materialelor lignocelulozice pretratate. 5
7
9
11

Exemplul 1

Pentru studierea efectului adaosului de FAME asupra delignifierii rumegușului și ulterior asupra hidrolizei enzimatică a rumegușului pretratată, primul exemplu se referă la o comparație între pretratamentul alcalin a diferitelor tipuri de rumeguș (rumeguș extras, rumeguș brut și rumeguș brut cu FAME). 13
15

a) Etapa de pretratament alcalin

Materia primă este rumegușul - rezidul de la fabricarea mobilei care conține lemn de esență tare (foioase - fag) și de esență moale (brad), măcinat la dimensiuni cuprinse între 0,315 și 0,5 mm. Pentru pretratament s-au folosit două tipuri de rumeguș: 17
19

1. *Rumeguș extras* - rumegușul folosit a fost măcinat iar prin sitare s-a separat fracția cu dimensiuni cuprinse între 0,315 și 0,5 mm. Înainte de pretratamentul alcalin, materialul lignocelulozic a fost extras succesiv cu amestec toluen:etanol = 1:2 (timp de 6 h) și apoi cu apă (timp de 2 h) pentru îndepărtarea cerurilor și a materialelor extractibile care pot acționa ca inhibitori în procesul de hidroliză enzimatică. 21
23
25

2. *Rumeguș brut* - rumegușul folosit a fost măcinat la dimensiuni cuprinse între 0,315 și 0,5 mm și utilizat în pretratamentul alcalin fără alte extracții. 27

Hidroliză alcalină a 2 g rumeguș (brut sau extras conform procedurii descrise mai sus) s-a realizat prin tratarea acestuia cu 200 mL soluție NaOH 1N, timp de 20 min, la temperatura de 25°C, cu agitare la 600 rpm. Rezidul se separă și spală cu apă distilată până la pH neutru. În cazul tratamentului alcalin în prezența FAME, se mai introduce o etapă de spălare cu o soluție slabă de surfactant (0,1%) pentru îndepărtarea completă a esterilor netransformați în săpun, care pot acționa ca inhibitori în procesul de hidroliză enzimatică. La finalul pretratamentului alcalin au fost prelevate probe din soluție pentru determinarea spectrofotometrică la 320 nm a ligninei solubile. Condițiile de pretratament alcalin și cantitatea de lignină separată sunt prezentate în tabelul 1. Materialul lignocelulozic rezultat în urma pretratamentului este supus hidrolizei enzimatică. 29
31
33
35
37

Condițiile de operare și rezultatele obținute în urma pretratamentului alcalin

Tabelul 1

Nr. exp.	Material lignocelulozic	Condiții de pretratament alcalin: temperatura de 25 °C, raport rumeguș: soluție alcalină 1:100, timp de pretratament 20 min	Lignină separată (mg/g _{substrat})*
1	Rumeguș extras	Soluție NaOH 1 N	10,75 ± 0,34
2	Rumeguș brut	Soluție NaOH 1 N	26,22 ± 0,17
3	Rumeguș brut	Soluție NaOH 1 N și adaos de 0,3% FAME	29,84 ± 0,63

*Toate experimentele s-au realizat în triplicat iar valorile rezultate sunt prezentate împreună cu deviația standard 41
43
45
47

RO 134127 B1

1 Din rezultatele prezentate în tabelul 1 se poate observa că delignificarea materialului
lignocelulozic este mai bună în cazul pretratamentului alcalin în prezența esterilor metilici ai
3 acizilor grași.

b) Etapa de hidroliza enzimatică

5 În procesul de hidroliză enzimatică materialul pretratată delignificat (din experimentele
anterioare) este în continuare amestecat cu o soluție tampon formată din acid citric -
7 Na_2HPO_4 pentru a asigura un $\text{pH} = 5$ optim pentru enzime. Procesele de hidroliză enzimatică
au fost efectuate în reactoare de 100 mL conținând un amestec de soluție de soluție tampon
9 și rumeguș într-un raport de 1:25 (greutate/volum solid/lichid). Peste acest amestec se
adaugă enzima - Celluclast 1,5 L într-un raport de 0,7 mL/g_{rumeguș}. Pentru a preveni contami-
11 narea bacteriană se adaugă și 0,5% antibiotic. Apoi, reactorul a fost plasat într-un agitator
orbital (120 rpm). Timpul de hidroliză este de 72 h și temperatura de reacție de 50°C. Pe
13 parcursul reacției au fost prelevate probe de hidroliza la 24, 48, și 72 h, care s-au trecut într-
un vas cu apă fierbinte (pentru dezactivarea enzimei) și centrifugate la 3500 rpm timp de
15 10 min. Supernatanții au fost stocați la frigider pentru analiza zaharurilor obținute. Cantitatea
de zaharuri reducătoare obținute în urma hidrolizei sunt prezentate în tabelul 2.

17 Din rezultatele prezentate în tabelul 2 se poate observa că prin hidroliza enzimatică
a rumegușului supus pretratamentului alcalin în prezența esterilor metilici ai acizilor grași s-a
19 obținut o cantitate mai mare de zaharuri reducătoare (ceea ce reprezintă aproximativ 30%
dn zaharurile totale din rumegușul studiat). Această creștere a cantității de zaharuri
21 demonstrează că utilizarea FAME în pretratamentul alcalin al materialelor lignocelulozice a
îndepărtat eficient o parte din lignină împreună cu materialele extractibile care pot fi inhibitori
23 ai procesului de hidroliză enzimatică.

Condițiile de operare și rezultatele obținute în urma hidrolizei enzimaticice

Tabelul 2

Nr. exp.	Material lignocelulozic supus hidrolizei enzimaticice	Conținutul de zaharuri reducătoare (mgGE/g _{substrat})*
1	Rumeguș extras pretratată alcalin	119,17 ± 5,34
2	Rumeguș brut pretratată alcalin fără FAME	110,96 ± 5,97
3	Rumeguș brut pretratată alcalin cu FAME	120,48 ± 2,98

33 *Toate experimetele s-au realizat în triplicat iar valorile rezultate sunt prezentate împreună cu deviația
standard

Exemplul 2

35 Pentru a pune în evidență eficiența adaosului de FAME în pretratamentul alcalin s-a
urmărit influența variației conținutului de FAME atât asupra cantității de lingină separată în
37 timpul pretratamentului alcalin cât și asupra cantității de zaharuri hidrolizate din rumegușul
pretratată.

a) Etapa de pretratament alcalin

41 Procedura de pretratament alcalin în prezența FAME este aceeași cu cea descrisă
în exemplul anterior, modificându-se cantitatea de FAME. În tabelul 3 sunt prezentate
43 condițiile de pretratament alcalin și conținutul de lignină separat în urma pretratamentului.
Materialul lignocelulozic rezultat în urma pretratamentului alcalin în prezența diferitelor
45 concentrații de FAME este supus hidrolizei enzimaticice.

RO 134127 B1

Condițiile de operare și rezultatele obținute în urma pretratamentului alcalin

Tabelul 3

Nr. exp.	Material lignocelulozic	Condiții de pretratament alcalin	Concentrație FAME (%)	Lignină separată (mg/g _{substrat})*
1	Rumeguș brut	Soluție NaOH 1 N, temperatura de 25 °C, raport rumeguș:soluție alcalină 1:100, timp de pretratament 20 min	0	26,22 ± 0,17
2	Rumeguș brut		16	28,01 ± 0,34
3	Rumeguș brut		3	29,84 ± 10,63
4	Rumeguș brut		5	32,66 ± 10,37

*Toate experimentele s-au realizat în triplicat iar valorile rezultate sunt prezentate împreună cu deviația standard

Din rezultatele prezentate în tabelul 3 se poate observa că deligniferea materialului lignocelulozic crește odată cu mărirea cantității de FAME adăugată la pretratamentul alcalin, cantitatea de lignină separată fiind cu până la 24,5% mai mare în prezența esterilor metilici ai acizilor grași comparativ cu procedeul în absența esterilor.

b) Etapa de hidroliza enzimatică

Hidroliza enzimatică a rumegușului pretratat alcalin folosind diferite concentrații de FAME s-a realizat în aceleași condiții ca în exemplul anterior. Condițiile de hidroliză și conținutul de zaharuri reducătoare obținut după 72 h de hidroliza enzimatică sunt prezentate în tabelul 4.

Condițiile de operare și rezultatele obținute în urma hidrolizei enzimatică

Tabelul 4

Nr. exp.	Rumeguș brut pretrat	Condiții de hidroliza enzimatică	Conținutul de zaharuri reducătoare (mgGE/g _{substrat})*
1	Alcalin + 0% FAME	Enzima comercială - Celluclast 1.5L, în cantitate de 0,7 mL/g _{rumeguș} , soluție tampon formată din acid citric și fosfat disodic pentru menținerea pH-ului la valoarea 5, temperatura de reacție 50°C, raport rumeguș:soluție tampon = 1:25, viteza de agitare 120 rpm, timp de hidroliza enzimatică 72 h	110,96 ± 5,97
2	Alcalin + 0,16 % FAME		119,61 ± 1,66
3	Alcalin + 0,3 % FAME		120,48 ± 2,98
4	Alcalin + 0,5 % FAME		135,14 ± 3,44

*Toate experimentele s-au realizat în triplicat iar valorile rezultate sunt prezentate împreună cu deviația standard

Din rezultatele prezentate în tabelul 4 se poate observa că prin hidroliza enzimatică a rumegușului supus pretratamentului alcalin în prezența esterilor metilici ai acizilor grași s-a obținut o cantitate mai mare de zaharuri reducătoare odată cu creșterea cantității de FAME utilizate în pretratamentul alcalin, obținându-se o creștere a concentrației zaharurilor reducătoare cu până la 21,8% față de cele obținute la hidroliza enzimatică a rumegușului pretrat în absența esterilor metilici ai acizilor grași.

Exemplul 3

În acest exemplu se evidențiază eficiența adaosului de FAME în pretratamentul alcalin atunci când se utilizează diferite concentrații de hidroxid de sodiu. S-a urmărit influența variației concentrației de NaOH atât asupra cantității de lignină separată în timpul pretratamentului alcalin cât și asupra cantității de zaharuri hidrolizate din rumegușul pretrat.

RO 134127 B1

a) Etapa de pretratament alcalin

Procedura de pretratament alcalin în prezența FAME este aceeași cu cea descrisă în exemplul anterior, modificându-se concentrația soluției alcaline de NaOH (0,1, 0,5 și 1 N). În tabelul 5 sunt prezentate condițiile de pretratament alcalin și conținutul de lignină separat în urma pretratamentului. Materialul lignocelulozic rezultat în urma pretratamentului alcalin este supus hidrolizei enzimatice.

Condițiile de operare și rezultatele obținute în urma pretratamentului alcalin

Tabelul 5

Nr. exp.	Material lignocelulozic	Condiții de pretratament alcalin	Concentrație NaOH (N)	Lignină separată (mg/g _{substrat})*
1	Rumeguș brut	FAME 0,3%, temperatura de 25°C, raport rumeguș:soluție alcalină 1:100, timp de pretratament 20 min	1	22,8 ± 0,19
2	Rumeguș brut		5	24,16 ± 0,28
3	Rumeguș brut		1	29,84 ± 10,63

* Toate experimentele s-au realizat în triplicat iar valorile rezultate sunt prezentate împreună cu deviația standard

Din rezultatele prezentate în tabelul 5 se poate observa că delignificarea materialului lignocelulozic este mai bună odată cu creșterea concentrației de hidroxid de sodiu folosită pentru pretratamentul alcalin.

b) Etapa de hidroliza enzimatică

Hidroliza enzimatică a rumegușului pretrat alcalin folosind diferite concentrații de hidroxid de sodiu s-a realizat în aceleași condiții ca în exemplele anterioare. Condițiile de hidroliză și conținutul de zaharuri reducătoare obținut după 72 h de hidroliză enzimatică sunt prezentate în tabelul 6.

Condițiile de operare și rezultatele obținute în urma hidrolizei enzimatice

Tabelul 6

Nr. exp.	Rumeguș brut pretrat	Condiții de hidroliza enzimatică	Conținutul de zaharuri reducătoare (mgGE/g _{substrat})*
1	Alcalin + FAME (Sol. NaOH 0,1 N)	Enzima comercială - Celluclast 1,5 L, în cantitate de 0,7 mL/g _{rumeguș} , soluție tampon formată din acid citric și fosfat disodic pentru menținerea pH-ului la valoarea 5, temperatura de reacție 50°C, raport rumeguș:soluție tampon = 1:25, viteza de agitare 120 rpm, timp de hidroliza enzimatică 72 h	50,89 ± 15,97
2	Alcalin + FAME (Sol. NaOH 0,5 N)		95,60 ± 1,66
3	Alcalin + FAME (Sol. NaOH 1N)		120,48 ± 12,98

* Toate experimentele s-au realizat în triplicat iar valorile rezultate sunt prezentate împreună cu deviația standard

Din rezultatele prezentate în tabelul 6 se poate observa că prin hidroliza enzimatică a rumegușului supus pretratamentului alcalin în prezența FAME s-a obținut o cantitate mai mare de zaharuri reducătoare pentru rumegușul pretrat cu soluții alcaline mai concentrate.

RO 134127 B1

Revendicare

1

Metodă de pretratament alcalin a biomasei lignocelulozice în prezența esterilor metilici ai acizilor grași, în vederea îndepărtării simultane a substanțelor extractibile și a ligninei, **caracterizată prin aceea că**, realizează tratarea a 2 g rumeguș, cu o dimensiune de 0,315...0,5 mm, timp de 20 min, cu 200 mL soluție NaOH cu o concentrație de 0,1...1 N, în care se introduc 0,1...0,5% față de volumul total de reacție, esteri metilici ai acizilor grași, la o temperatură de 25°C, cu agitare la 600 rpm, urmată de separarea rezidului și spălarea cu apă distilată până la pH neutru și cu o soluție apoasă de 0,1% surfactant în sine cunoscut, filtrarea rezidului pretrat și hidroliza enzimatică a acestuia în amestec cu o soluție tampon de acid citric - fosfat disodic la un raport rumeguș pretrat:soluție tampon de 1:25 greutate/volum solid/lichid, utilizând ca biocatalizator - enzimă de tip celuloză într-un raport de 0,7 mL/g_{rumeguș}, timp de 72 h la temperatura de 50°C și viteza de agitare 120 rpm, obținându-se o delignifiere a rumegușului cu până la 24,5% și o creștere a concentrației zaharurilor reducătoare cu până la 21,8% față de cele obținute la hidroliza enzimatică a rumegușului pretrat în absența esterilor metilici ai acizilor grași.

