

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI  
MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI  
FACULTATEA DE HORTICULTURĂ**

**SPECIALIZAREA  
"TEHNOLOGIA PRODUSELOR AGROALIMENTARE"**

**VALORIFICAREA UNOR SUBPRODUSE ȘI DEȘEURI  
AGRICOLE DE NATURĂ LIGNOCELULOZICĂ PRIN  
ZAHARIFICARE ȘI FERMENTARE SIMULTANĂ**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**Coordonator științific,  
Prof. Univ. Dr. GHEORGHE CÂMPEANU**

**Doctorand,  
Șef lucrări FLORENTINA ISRAEL-ROMING**

**BUCUREȘTI  
2005**

## CUPRINS

INTRODUCERE.....	6
<b>PARTEA I. STUDIU DOCUMENTAR.....</b>	<b>8</b>
CAPITOLUL 1. Componentele biomasei de natură celulozică și structura lor.....	9
1.1. Celuloza.....	9
1.1.1. Structura celulozei.....	9
1.1.2. Proprietăți fizice.....	13
1.1.3. Proprietăți chimice.....	14
1.2. Hemicelulozele.....	16
1.3. Lignina.....	17
1.4. Materiile pectice.....	19
1.5. Subproduse și deșuri agroalimentare de natură lignocelulozică.....	20
 CAPITOLUL 2. Sistemul polienzimatic celulazic.....	 23
2.1. Componentele sistemului celulazic.....	23
2.2. Specificitatea de substrat a celulazelor.....	24
2.3. Adsorbția celulazelor la suprafața celulozei.....	26
2.4. Sinergismul dintre componentele sistemului celulazic.....	27
2.5. Aspecte ale mecanismului general de degradare a celulozei.....	29
 CAPITOLUL 3. Pretratamente aplicate materialelor lignocelulozice.....	 34
3.1. Pretratamente mecanice.....	34
3.2. Pretratamente fizice.....	36
3.2.1. Pretratamente cu vapori.....	36
3.2.2. Pretratamente prin iradiere.....	37
3.3. Pretratamente chimice.....	37
3.3.1. Pretratamente alcaline.....	37
3.3.2. Pretratamente acide.....	38
3.3.3. Pretratamente cu agenți oxidanți.....	40
3.4. Pretratamente biologice.....	40
3.5. Pretratamente combinate.....	41
 CAPITOLUL 4. Degradarea microbiană a materialelor lignocelulozice.....	 43
4.1. Microorganisme implicate în degradarea materialelor lignocelulozice...	43
4.2. Degradarea celulozei cu tulpini de <i>Trichoderma viride</i> .....	45
4.2.1. Optimizarea producerii de celuloze.....	45
4.2.2. Limitarea represiei catabolice.....	48
4.3. Culturi mixte.....	49
4.4. Valorificarea unor materiale lignocelulozice prin bioconversie.....	50
 <b>PARTEA a II-a. REZULTATE EXPERIMENTALE.....</b>	 <b>55</b>
CAPITOLUL 5. Creșterea susceptibilității materialelor lignocelulozice la hidroliza enzimatică.....	56
5.1. Materiale și metode de lucru.....	56
5.1.1. Materiale folosite.....	56
5.1.2. Metode de lucru.....	57

5.2. Influența pretratamentului alcalin asupra degradării enzimatică a materialelor lignocelulozice.....	62
5.3. Influența pretratamentului alcalino-peroxidic asupra degradării enzimatică a materialelor lignocelulozice.....	65
5.4. Optimizarea pretratamentului alcalino-peroxidic.....	75
5.4.1. Optimizarea temperaturii pretratamentului alcalino-peroxidic aplicat unor materiale lignocelulozice.....	75
5.4.2. Optimizarea timpului pretratamentului alcalino-peroxidic aplicat unor materiale lignocelulozice.....	77
5.4.3. Optimizarea dimensiunii materialelor lignocelulozice.....	78
5.4.4. Optimizarea raportului material lignocelulozic:soluție alcalino-peroxidică.....	79
5.5. Influența pretratamentelor asupra structurii materialelor lignocelulozice.....	80
5.5.1. Analiza spectrală FTIR - transmisie.....	80
5.5.2. Analiza spectrală FTIR-ATR.....	84
5.6. Concluzii.....	85
<b>CAPITOLUL 6. Selectarea unor tulpini fungice înalt producătoare de celulaze.....</b>	<b>87</b>
6.1. Materiale și metode de lucru.....	87
6.1.1. Materiale folosite.....	87
6.1.2. Metode de lucru.....	89
6.2. Screening-ul tulpinilor cu potențial celulozolic.....	94
6.3. Concluzii.....	96
<b>CAPITOLUL 7. Zaharificarea și fermentarea simultană a unor materiale de natură lignocelulozică.....</b>	<b>97</b>
7.1. Materiale și metode de lucru.....	97
7.1.1. Materiale folosite.....	97
7.1.2. Metode de lucru.....	99
7.2. Influența culturii mixte asupra sintezei celulelor.....	99
7.3. Influența raportului fung:drojdie asupra sintezei celulelor.....	108
7.4. Alegerea momentului optim de inoculare a drojdiei.....	110
7.5. Influența concentrației sursei de carbon asupra culturii mixte.....	111
7.6. Concluzii.....	113
<b>CAPITOLUL 8. Posibilități de valorificare a materialelor lignocelulozice prin cultură mixtă.....</b>	<b>114</b>
8.1. Materiale și metode de lucru.....	115
8.1.1. Materiale folosite.....	115
8.1.2. Metode de lucru.....	116
8.2. Obținerea preparatului enzimatic purificat.....	120
8.2.1. Separarea complexului celulozic prin precipitare cu acetonă.....	121
8.2.2. Separarea prin adsorbție pe hidroxilapatită.....	121
8.2.3. Separarea prin cromatografie de schimb ionic.....	122
8.3. Caracterizarea preparatului enzimatic purificat.....	125
8.3.1. Determinarea parametrilor cinetici.....	125
8.3.2. Determinarea pH-ului optim de acțiune.....	126
8.3.3. Determinarea temperaturii optime de acțiune.....	128

---

8.3.4. Determinarea compoziției în aminoacizi prin analiză HPLC.....	129
8.4. Valorificarea reziduului.....	132
8.5. Concluzii.....	134
CONCLUZII GENERALE.....	136
BIBLIOGRAFIE.....	140
ANEXĂ.....	154

## INTRODUCERE

Biomasa celulozică, rezultată din procesele de fotosinteză, este incontestabil cea mai abundentă resursă reînnoibilă, producția mondială fiind de ordinul miliardelor de tone anual. Folosirea de către om a acestei imense resurse conduce la producerea de cantități mari de deșeuri și subproduse ce conțin celuloză, ceea ce are ca rezultat implicit deteriorarea mediului. Degradarea acestor deșeuri și subproduse, și valorificarea lor sub formă de substanțe organice sau energie este unul din domeniile ce au polarizat atenția cercetătorilor în ultimele decenii.

Un obiectiv vital al biotehnologiei mileniului II este conversia enzimatică a biomasei celulozice ce se reînnoiește permanent. Astfel, procese fermentative noi și din ce în ce mai eficiente au ca obiectiv transformarea acestei “monede” biologice într-o serie de produse de consum.

Cele mai comune surse de celuloză sunt lemnul și bumbacul. Pentru utilizări industriale, sursa majoră de celuloză este lemnul, chiar dacă puritatea  $\alpha$ -celulozei obținute nu este foarte mare. Derivatele de celuloză folosite în industria farmaceutică, în cea a vopselurilor și explozivilor sunt de obicei obținute din bumbac. Totuși, trebuie să fie investigate și alte surse alternative de celuloză, fiind vizate în special o serie de deșeuri și subproduse cu conținut lignocelulozic, pentru care valorificarea ar putea rezolva și o serie de probleme ecologice.

Pentru a putea valorifica mai eficient această resursă imensă, ce se reînnoiește în permanență, trebuie să se cunoască cât mai bine particularitățile legate de structura și proprietățile celulozei. În ultimii douăzeci de ani, interesul din ce în ce mai mare pentru această problemă, cât și dezvoltarea unor tehnici moderne de investigare a condus la elucidarea unor noi aspecte legate de poliglucidele parietale.

Poliglucidele structurale din regnul vegetal sunt compuși ternari, de următoarele tipuri principale: celuloze, hemiceluloze, pectine și gume. Aceștia au proprietatea de a forma agregate macromoleculare mono și bidimensionale, constituind catene lineare și ramificate. Rezistența mecanică nu poate fi conferită exclusiv prin participarea lor. De aceea, aceste structuri poliglucidice sunt stabilizate, de fapt rigidizate, prin prezența altor compuși tridimensionali, respectiv ligninele.

Astfel, se poate afirma că structura parietală de tip vegetal este definită cantitativ de raportul celuloze-hemiceluloze-pectine-lignine. Este evident faptul că variația a patru

tipuri de compuși (chiar dacă trei dintre ei sunt destul de înrudiți structural) conduce la realizarea unor structuri parietale specifice.

Transformarea polimerului celulozic în alți compuși utili, este posibilă prin scindarea sa în entități cu masă moleculară mică, ideal unități monomerice glucidice. Această conversie poate fi făcută fie prin metode chimice, fie prin metode enzimatic. Metodele enzimatic sunt din ce în ce mai mult abordate datorită modului selectiv de acțiune, eliminând astfel posibilitatea formării de produși secundari nedorți.

Viteza și gradul de hidroliză enzimatică depind de suprafața celulozei expusă efectiv atacului enzimelor celulozolitice. De aceea, pentru a crește regiunile amorfe și suprafața ce poate fi atacată enzimatic, este esențială aplicarea prealabilă a unui pretratament. Pretratamentele pot fi de natură fizică, cum sunt măcinarea și mărunțirea, piroliza, explozia în vapori cu înaltă presiune, și de natură chimică, cum ar fi tratarea cu alcalii, acizi sau agenți de oxidare. Astăzi, în vederea creșterii eficienței acestor pretratamente, ele se practică cuplate două sau mai multe.

Microorganismele ce sunt implicate în degradarea celulozei includ bacterii, actinomicete și fungi. Dintre acestea, fungii sunt cei mai des utilizați, atât pentru realizarea de studii privind degradarea celulozei, cât și într-o serie de aplicații industriale. Totuși, trebuie menționat că, deși există numeroși fungi ce cresc pe celuloză sau produc enzime care degradează celuloza amorfă, puțini dintre aceștia produc extracelular un sistem celulozic complet capabil să degradeze celuloza cristalină. În natură, succesul microorganismelor în degradarea materialelor lignocelulozice este datorat în mare măsură acțiunii sinergice a acestora, incluzând chiar și speciile care nu au potențial celulozolic.

Această lucrare prezintă cercetările derulate în vederea realizării unui proces de bioconversie a unor deșeuri agroalimentare, având ca obiectiv final valorificarea integrală a mediului de cultură.

Pentru experimentele prezentate în această lucrare, s-au utilizat ca material lignocelulozic paie de grâu și de orz. Ele au o digestibilitate foarte scăzută (45 - 50%), sunt prea sărace în totalitatea constituenților intracelulari (minerale, proteine etc.), necesari, mai întâi pentru microorganisme, apoi pentru animalul gazdă.

În urma aplicării unui pretratament adecvat, care să îmbunătățească susceptibilitatea acestora la atacul enzimatic, deșeurile menționate au fost utilizate într-un procedeu de bioconversie, ca sursă de carbon pentru cultivarea unor microorganisme cu potențial lignocelulozic.